



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

**EVALUACIÓN DE LA  
PRESENCIA DE  
FÁRMACOS  
VETERINARIOS EN  
PIENSOS DE GALICIA**

Rosa Elvira Gavilán García

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORAMENTO EN INNOVACIÓN EN SEGURIDAD  
Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIAS

LUGO

2019





## DECLARACIÓN DA AUTORA DA TESE

### Evaluación de la presencia de fármacos veterinarios en piensos de Galicia

Dna. Rosa Elvira Gavilán García

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

*En Lugo, 29 de xullo de 2019*

Asdo.



**AUTORIZACIÓN DO  
DIRECTOR / TITOR DA TESE**  
**“Evaluación de la presencia de fármacos  
veterinarios en piensos de Galicia”**

Dna. Beatriz Isabel Vázquez Belda  
Dna. Carolina Graciela Nebot García

INFORMAN:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. **Rosa Elvira Gavilán García**, baixo a nosa dirección, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directoras desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Lugo, 29 de xullo de 2019*

Asdo. Beatriz Isabel  
Vázquez Belda

Asdo. Carolina Graciela  
Nebot García



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al catedrático D. Alberto Cepeda Sáez que me haya dado todas las facilidades, poniendo a mi disposición todos los medios necesarios para realizar esta tesis doctoral en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, del que él es director.

Muy especialmente, quiero mostrar mi agradecimiento a mis directoras de tesis, Dra. Beatriz Vázquez y Dra. Carolina Nebot, ya que gracias ellas esto ha sido posible. Beatriz, porque con su dedicación, experiencia y capacidad resolutive ha sabido motivarme en los momentos en que me vencía el escepticismo y porque nuestra amistad fue, es y seguirá siendo siempre lo primero. Carolina, porque su generosidad sin límites ha sido una lección de vida, tanto o más importante aún que lo que me han aportado su amplio conocimiento científico y sólida experiencia cuando trabajamos juntas; un privilegio para mí.

Agradezco enormemente a Ewelina Patyra su importante participación en nuestra investigación y su hospitalidad y cariño. Gracias a José Antonio Alvarez y a María Veiga, por su colaboración y por el estupendo trabajo en equipo que disfrutamos. Quiero agradecer a Verónica Piñeiro el haberme sacado de más de un apuro cuando el funcionamiento instrumental no acompañaba. También agradezco a Patricia Regal haberme ayudado a salir del atolladero en algún momento en que yo no acertaba a ver la solución.

A los miembros de la Asociación de Fabricantes de Alimentos Compuestos de Galicia (AGAFAC), a los granjeros que participaron en el estudio de la Red de Estudio Multidisciplinar de los Rumiantes en Galicia (RUMIGAL) dándonos acceso a sus granjas para recoger muestras y a los responsables técnicos de ambos organismos, por la confianza y el apoyo que todos ellos han depositado en esta investigación y en los resultados de la misma.

Tengo presente a mis compañeros, el excepcional equipo humano que trabaja en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, así como en Deinal Soluciones Agroalimentarias, porque a todos ellos, sin excepción, debo agradecer que me hayan ayudado durante estos años, tanto en mi crecimiento personal como profesional.

Gracias a mi familia, por haberme regalado una parte importante de su tiempo para que yo pudiera llevar a cabo este trabajo. A mi marido, por respetar mis elecciones y por animarme siempre a ir hacia adelante cuando yo no lo veo claro. A mi hijo, por ser mi maestro desde que llegó a este mundo, haciendo que me esfuerce en ser mejor persona cada día.



## ACRÓNIMOS

|             |  |
|-------------|--|
| AAFCO       | Del inglés Association of American Feed Control Officials    |
| ACN         | Acetonitrilo   |
| AEMPS       | Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios      |
| AOAC        | Del inglés Association of Official Analytical Chemist        |
| API         | Ionización a presión atmosférica                             |
| CC $\alpha$ | Límite de decisión   |
| CC $\beta$  | Capacidad de detección                                       |
| CEP         | Potencial de entrada a la celda de colisión                  |
| CV          | Coefficiente de variación                                    |
| CVMP        | Del inglés Committee of Medicinal Products of Veterinary Use |
| CXP         | Potencial de salida de la celda                              |
| DOUE        | Diario Oficial de la Unión Europea                           |
| DP          | Potencial de ionización                                      |
| DAD         | Detector de Diodo Array                                      |
| EC          | Energía de colisión  |
| ECDC        | European Center of Disease Prevention and Control            |
| EDTA        | Acido etilenodiaminotetraacético                             |

|            |  |
|------------|--|
| EFSA       | European Food Safety Authority   |
| EMA        | European Medicines Agency  |
| EP         | Potencial de entrada   |
| ESI        | Ionización en electrospray   |
| ESVAC      | European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption              |
| FAO        | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  |
| FEDNA      | Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal               |
| FEEDAP     | Panel de Aditivos y Productos o Sustancias usados en Alimentación Animal   |
| FEFAC      | Federación Europea de Fabricantes de Alimentos Compuestos                  |
| FL         | Fluorescencia  |
| HPLC-MS/MS | Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrómetro de masas |
| INTER2000  | Programa de circuitos de intercomparación                                  |
| IR         | Infra-rojo   |
| IS         | Patrón interno   |
| LC         | Cromatografía líquida  |
| LM         | Límite Máximo  |
| LDD        | Límite de detección  |
| LDC        | Límite de cuantificación   |



|                    |  |
|--------------------|--|
| LMR                | Límite máximo residual   |
| LP                 | Límite permitido   |
| LV                 | Límite de validación   |
| MAPAMA             | Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente                                  |
| MRM                | Del inglés Multiple reaction monitoring  |
| MRPL               | Límite de funcionamiento mínimo exigido  |
| MS                 | Masas  |
| OMS                | Organización Mundial de la Salud   |
| PCU                | Unidad de Corrección de la Población   |
| PRAN               | Plan Nacional frente a Resistencia a Antibióticos  |
| PSA                | Amina Primaria Secundaria  |
| RSD                | Desviación estándar relativa   |
| RSD <sub>r</sub>   | Desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad                                     |
| RSD <sub>R</sub>   | Desviación estándar relativa en condiciones de reproducibilidad                                  |
| RSD <sub>RYa</sub> | Desviación estándar relativa de la reproducibilidad intralaboratorio de la ordenada en el origen |
| Rt                 | Tiempo de retención  |
| RUMIGAL            | Red de estudio multidisciplinar de los rumiantes en Galicia                                      |
| S/N                | Relación Señal/Ruido   |

|       |  |
|-------|--|
| SPE   | Extracción en fase sólida                      |
| TCA   | Acido tricloroacético                          |
| TIC   | Del inglés Total Ion Chromatogram              |
| TLC   | Cromatografía en capa fina                     |
| UE    | Unión Europea                                  |
| UPLC® | Cromatografía líquida de ultra-alta resolución |
| UHPLC | Cromatografía líquida de ultra-alta resolución |
| UV    | Ultravioleta                                   |



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1. EL PIENSO</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1.1. Tipos de piensos que se emplean en producción animal</b>                              | <b>2</b>  |
| 1.1.1.1. Pienso completos y complementarios   | 2         |
| 1.1.1.2. Pienso medicamentosos  | 3         |
| 1.1.1.3. Pienso con aditivos  | 6         |
| 1.1.1.4. Pienso de producción ecológica   | 8         |
| <b>1.2. LA ELABORACIÓN DEL PIENSO</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.2.1. Principales etapas en la elaboración del pienso</b>                                   | <b>9</b>  |
| <b>1.2.2. Materias primas empleadas en la elaboración de piensos</b>                            | <b>12</b> |
| <b>1.3. ANTIMICROBIANOS Y ANTIPARASITARIOS UTILIZADOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL</b>                  | <b>16</b> |
| <b>1.3.1. Antimicrobianos</b>   | <b>17</b> |
| 1.3.1.1. Tetraciclinas  | 20        |
| 1.3.1.2. Sulfonamidas y trimetoprim   | 21        |
| 1.3.1.3. Fenicoles  | 22        |
| <b>1.3.2. Agentes antiparasitarios: coccidiostáticos e histomonóstatos</b>                      | <b>23</b> |
| <b>1.4. LA PRODUCCIÓN DE PIENSO DESDE UNA PERSPECTIVA GLOBAL HASTA UN ENTORNO NACIONAL</b>      | <b>27</b> |
| <b>1.4.1. Producción global</b>   | <b>27</b> |
| <b>1.4.2. Producción en Europa</b>  | <b>28</b> |
| <b>1.4.3. La producción de piensos en España</b>  | <b>30</b> |
| <b>1.5. CONTROL DE TETRACICLINAS, SULFONAMIDAS, FENICOLES Y COCCIDIOSTÁTICOS EN LOS PIENSOS</b> | <b>36</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>1.5.1. La importancia de la contaminación cruzada</b>   | 36 |
| <b>1.5.2. Métodos de detección y cuantificación</b>  | 39 |
| 1.5.2.1. Validación de los métodos analíticos  | 44 |
| <b>1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | 48 |
| <b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b>   | 63 |
| <b>CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE COCCIDIOSTÁTICOS Y SULFONAMIDAS EN PIENSOS</b> | 65 |
| <b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>   | 65 |
| <b>3.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | 72 |
| 3.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo   | 72 |
| 3.2.2. Equipamiento  | 73 |
| 3.2.3. Condiciones HPLC-MS/MS  | 73 |
| 3.2.4. Extracción de muestras  | 76 |
| 3.2.5. Validación del método   | 82 |
| 3.2.6. Muestras  | 83 |
| <b>3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | 83 |
| 3.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS   | 83 |
| 3.3.2. Optimización del protocolo de extracción  | 85 |
| 3.3.3. Validación del método   | 90 |
| 3.3.4. Resultados de las muestras analizadas   | 94 |
| <b>3.4. CONCLUSIONES</b>   | 96 |
| <b>3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA CUANTIFICAR TETRACICLINAS EN PIENSOS</b>                     | 103 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN  | 103 |
| 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS  | 105 |
| 4.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo   | 105 |
| 4.2.2. Equipamiento  | 106 |
| 4.2.3. Condiciones del HPLC-MS/MS  | 106 |
| 4.2.4. Extracción de muestras  | 107 |
| 4.2.5. Validación del método HPLC-MS/MS  | 108 |
| 4.2.6. HPLC acoplado a un detector de fluorescencia  | 112 |
| 4.2.7. Muestras  | 112 |
| 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN  | 113 |
| 4.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS   | 113 |
| 4.3.2. Optimización del protocolo de extracción  | 114 |
| 4.3.3. Validación del método   | 116 |
| 4.3.4. Comparación entre los métodos HPLC-MS/MS y HPLC-Fluorescencia                                     | 119 |
| 4.3.5. Resultados de las muestras analizadas   | 119 |
| 4.4. CONCLUSIONES  | 120 |
| 4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 120 |
| <b>CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE TETRACICLINAS EN PIENSOS</b> | 125 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN  | 125 |
| 5.2. MATERIAL Y MÉTODOS  | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>5.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo</b>  | 128 |
| <b>5.2.2. Equipamiento</b>   | 129 |
| <b>5.2.3. Condiciones HPLC-MS/MS</b>   | 130 |
| <b>5.2.4. Extracción de las muestras</b>   | 130 |
| <b>5.2.5. Validación del método</b>  | 131 |
| <b>5.2.6. Muestras</b>   | 133 |
| <b>5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | 133 |
| <b>5.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS</b>  | 133 |
| <b>5.3.2. Optimización del protocolo de extracción</b>   | 135 |
| <b>5.3.3. Validación del método</b>  | 136 |
| <b>5.3.4. Resultados de las muestras analizadas</b>  | 140 |
| <b>5.4. CONCLUSIONES</b>   | 140 |
| <b>5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | 141 |
| <b>CAPÍTULO 6. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE FENICOLES EN PIENSOS</b> | 147 |
| <b>6.1. INTRODUCCIÓN</b>   | 147 |
| <b>6.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | 149 |
| <b>6.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo</b>  | 149 |
| <b>6.2.2. Equipamiento</b>   | 150 |
| <b>6.2.3. Condiciones HPLC-MS/MS</b>   | 150 |
| <b>6.2.4. Extracción de las muestras</b>   | 151 |
| <b>6.2.5. Validación del método</b>  | 153 |
| <b>6.2.6. Muestras</b>   | 155 |
| <b>6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | 155 |
| <b>6.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS</b>  | 155 |
| <b>6.3.2. Optimización del protocolo de extracción</b>   | 156 |
| <b>6.3.3. Validación del método</b>  | 157 |
| <b>6.3.4. Resultados de las muestras analizadas</b>  | 159 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>6.4. CONCLUSIONES</b>               | 160 |
| <b>6.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> | 160 |
| <b>7. CONCLUSIONES GENERALES</b>       | 167 |
| <b>APÉNDICE</b>                        | 171 |







## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1. Diagrama general de fabricación de piensos   | 11 |
| Figura 1.2. Ventas de antimicrobianos (mg/PCU) en los diez países de la UE con mayor volumen declarado   | 17 |
| Figura 1.3. Fórmulas terapéuticas de agentes antimicrobianos (mg/PCU) en los diez países con mayor venta de premezclas durante el año 2016       | 18 |
| Figura 1.4. Porcentaje de ventas de los principales grupos de antimicrobianos en Europa en 2016  | 19 |
| Figura 1.5. Porcentaje de ventas de los principales grupos de antimicrobianos en España en 2016  | 20 |
| Figura 1.6. Estructura de las tetraciclinas utilizadas en piensos medicados  | 21 |
| Figura 1.7. Estructura de las sulfonamidas comúnmente utilizadas y de trimetoprim  | 22 |
| Figura 1.8. Estructura del cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol  | 23 |
| Figura 1.9. Estructura de los coccidiostáticos ionóforos utilizados con más frecuencia en piensos  | 24 |
| Figura 1.10. Estructura de los coccidiostáticos no ionóforos utilizados más frecuentemente en piensos  | 25 |
| Figura 1.11. Cuadro de incompatibilidades de los coccidiostáticos para la fabricación de piensos de las distintas especies de animales de abasto | 26 |
| Figura 1.12. Producción de piensos compuestos (millones de Tm) en los países de la Unión Europea en 2016   | 29 |
| Figura 1.13. Porcentajes de producción ganadera en España en 2016  | 31 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1.14. Diagrama general de un espectrofotómetro de masas de triple cuadrupolo   | 42  |
| Figura 3.1. Cromatograma MRM de muestra de pienso blanco  | 77  |
| Figura 3.2. Cromatogramas MRM de los coccidiostáticos investigados en una muestra de pienso enriquecida con 100 $\mu\text{g/kg}$                          | 78  |
| Figura 3.3. Cromatogramas MRM de las sulfonamidas y trimetoprim investigadas en una muestra de pienso dopada a 100 $\mu\text{g/kg}$                       | 80  |
| Figura 3.4. Porcentaje de recuperación de las sulfonamidas con distintos solventes  | 87  |
| Figura 3.5. Protocolo de extracción de coccidiostáticos y sulfonamidas en piensos a nivel de traza  | 89  |
| Figura 4.1. Protocolo de extracción de tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina y clortetraciclina en piensos medicados para su análisis por HPLC-MS/MS | 108 |
| Figura 4.2. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra blanco  | 110 |
| Figura 4.3. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra fortificada a 50 $\mu\text{g/kg}$   | 111 |
| Figura 5.1. Protocolo de extracción de tetraciclinas en piensos para su detección y cuantificación a nivel de residuos                                    | 131 |
| Figura 5.2. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra de blanco   | 136 |
| Figura 5.3. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra fortificada a 400 $\mu\text{g/kg}$  | 137 |
| Figura 5.4. Cromatogramas MRM de las tetraciclinas individuales en una muestra enriquecida a 400 $\mu\text{g/kg}$   | 137 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 6.1. Protocolo de extracción de fenicoles presentes en pienso              | 152 |
| Figura 6.2. Cromatogramas MRM de fenicoles en una muestra blanco                  | 154 |
| Figura 6.3. Cromatogramas MRM de fenicoles en una muestra fortificada a 200 µg/kg | 154 |





## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1.1. Lista de principios activos antimicrobianos para los que se establecerán LM, como consecuencia de contaminación cruzada   | 6  |
| Tabla 1.2. Volumen de producción de piensos para vacuno, porcino y aves en Europa durante 2016   | 29 |
| Tabla 1.3. Datos de producción de piensos (Tm) para las principales especies de abasto, por especie y por comunidad autónoma durante 2016  | 33 |
| Tabla 1.4. Producción de piensos (Tm) y porcentaje de cada tipo según especie, en España durante 2016  | 35 |
| Tabla 1.5. Producción en España de los diferentes tipos de piensos   | 36 |
| Tabla 1.6. Rangos de recuperación aceptados por la Decisión 2002/657/CE para los métodos confirmatorios  | 46 |
| Tabla 1.7. Valores máximos permitidos de $RSD_R$ para los métodos cuantitativos en un intervalo de fracciones de masa del analito  | 47 |
| Tabla 1.8. Cálculo de $CC\alpha$ y $CC\beta$ para sustancias con LMR y sustancias sin LMR  | 47 |
| Tabla 3.1. Aditivos autorizados para piensos en piensos a los que no están destinados como resultado de una transferencia inevitable   | 66 |
| Tabla 3.2. Coccidiostáticos y sulfonamidas objeto de estudio   | 72 |
| Tabla 3.3. $R_t$ , iones precursor y producto ( $(m/z)^+$ ), DP, EP, CEP, EC y CXP empleados para cada transición MRM  | 75 |
| Tabla 3.4. Recuperación (%), $RSD_r$ , $RSD_R$ , LM ( $\mu g/kg$ ), $CC\alpha$ ( $\mu g/kg$ ), $CC\beta$ ( $\mu g/kg$ ), LDD ( $\mu g/kg$ ) y LDC ( $\mu g/kg$ ) de los coccidiostáticos | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 3.5. Recuperación (%), $RSD_r$ , $RSD_R$ , $CC\alpha$ ( $\mu\text{g/kg}$ ), $CC\beta$ ( $\mu\text{g/kg}$ ), LDD ( $\mu\text{g/kg}$ ) y LDC ( $\mu\text{g/kg}$ ) de las sulfonamidas y trimetoprim             | 92  |
| Tabla 4.1. $R_t$ (min), iones precursor y producto ( $(m/z)^+$ ), CV (V) y EC (V) empleados para la identificación de las tetraciclinas   | 114 |
| Tabla 4.2. Recuperaciones (%), $RSD_r$ y $RSD_R$ obtenidas con la validación del método HPLC-MS/MS y a 50 mg/kg con el método HPLC-Fluorescencia  | 117 |
| Tabla 5.1. $R_t$ (min), iones precursor y producto ( $(m/z)^+$ ), CV (V) y EC (V) empleados para la identificación de las tetraciclinas   | 134 |
| Tabla 5.2. Recuperaciones (%), $RSD_r$ , $RSD_R$ , $CC\alpha$ ( $\mu\text{g/kg}$ ), $CC\beta$ ( $\mu\text{g/kg}$ ), LDD ( $\mu\text{g/kg}$ ) y LDC ( $\mu\text{g/kg}$ ) de las tetraciclinas                        | 138 |
| Tabla 6.1. $R_t$ , iones precursor y producto ( $(m/z)^+$ ), CV y EC empleados para la identificación   | 151 |
| Tabla 6.2. Recuperaciones (%), $RSD_r$ , $RSD_R$ , $CC\alpha$ ( $\mu\text{g/kg}$ ), $CC\beta$ ( $\mu\text{g/kg}$ ), LDD ( $\mu\text{g/kg}$ ) y LDC ( $\mu\text{g/kg}$ ) de cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol | 158 |

## RESUMEN

El empleo de sustancias farmacológicas añadidas en los piensos con fines terapéuticos es una práctica común en la Unión Europea. Estas sustancias pertenecen a diferentes grupos de fármacos y su dosificación varía según su naturaleza, especie animal de destino, etc. Los antiparasitarios y los antimicrobianos son los grupos de sustancias utilizadas más frecuentemente. La fabricación de piensos aditivados (coccidiostáticos) y medicados (antimicrobianos), con dosis superiores a 1 mg/kg puede dar lugar a la transferencia inevitable de residuos de estas sustancias a piensos a los que no están destinadas. Efectos adversos tales como influencia sobre la microbiota del tubo digestivo, desarrollo de bacterias con genes de resistencia e ineficacia de tratamientos en los animales, además de problemas de seguridad alimentaria, pueden ser consecuencias del consumo prolongado de este tipo de piensos. La legislación vigente dicta límites máximos de coccidiostáticos y establece que antes de 2023 deberán fijarse límites máximos para determinados antimicrobianos. En consecuencia, es necesario disponer de métodos fiables para el análisis de estas sustancias en piensos.

En base a esto, este trabajo de investigación presenta cuatro métodos confirmatorios basados en HPLC-MS/MS para cuantificar antiparasitarios y antimicrobianos en piensos de diferentes especies animales. Estos métodos fueron validados según la legislación vigente y se aplicaron en muestras obtenidas de granjas y fábricas de pienso con el fin de evaluar la presencia de contaminación cruzada. Mientras los fenicoles sólo se detectaron en muestras de fábricas (3%), las sulfonamidas, las tetraciclinas y los coccidiostáticos se detectaron tanto en piensos de granjas como de fábricas; en particular, las sulfonamidas fueron el grupo detectado en un mayor número de muestras (39% en granjas y 36% en fábricas). Esta mayor frecuencia de detección puede deberse a un menor control de la presencia de estos residuos en pienso.

**Palabras clave:** Piensos, contaminación cruzada, antimicrobianos, coccidiostáticos, HPLC-MS/MS.





## RESUMO

O emprego de sustancias farmacolóxicas engadidas os piensos con fins terapéuticos é una práctica común na Unión Europea. Estas sustancias pertencen a diferentes grupos de fármacos e a súa dosificación varía segunda a súa natureza, especie animal de destino, etc. Os antiparasitarios e os antimicrobianos son os grupos de sustancias utilizadas máis frecuentemente. A fabricación de piensos aditivados (coccidiostáticos) e medicados (antimicrobianos), con doses superiores a 1 mg/kg pode dar lugar á transferencia inevitable de residuos destas sustancias a piensos aos que non están destinadas. Efectos adversos tales como influencia sobre a microbiota do tubo dixestivo, desenvolvemento de bacterias con xenes de resistencia e ineficacia de tratamentos nos animais, ademáis de problemas de seguridade alimentaria, poden ser consecuencias do consumo prolongado deste tipo de piensos. A lexislación vixente dita límites máximos de coccidiostáticos e establece que antes de 2023 deberán fixarse límites máximos para determinados antimicrobianos. En consecuencia, é necesario dispoñer de métodos fiables para a análise destas sustancias en piensos.

En base a isto, este traballo de investigación presenta catro métodos confirmatorios baseados en HPLC-MS/MS para cuantificar antiparasitarios e antimicrobianos en piensos de diferentes especies animais. Estes métodos foron validados segundo a lexislación vixente e aplicáronse en mostras obtidas de granxas e fábricas de pienso co fin de avaliar a presenza de contaminación cruzada. Mentres os fenicoles só se detectaron en mostras de fábricas (3%), as sulfonamidas, as tetraciclinas e os coccidiostáticos detectáronse tanto en piensos de granxas como de fábricas; en particular, as sulfonamidas foron o grupo detectado nun maior número de mostras (39% en granxas e 36% en fábricas). Esta maior frecuencia de detección pode deberse a un menor control da presenza destes residuos en pienso.

**Palabras clave:** Pensos, contaminación cruzada, antimicrobianos, coccidiostáticos, HPLC-MS/MS.



## SUMMARY

The use of pharmacological substances added to feed for therapeutic purposes is a common practice within the European Union. These substances belong to different therapeutic groups and their dosage can vary according to their nature, animal species of destination, etc. The more frequently administrated groups are antiparasitic and antimicrobials. The production of medicated feed and feed with coccidiostats, normally with concentration higher than 1 mg/kg could lead to the unavoidable cross contamination to further batches of feed. Adverse effect such as alteration of the gut microbiota, development of bacteria with resistant gens or inefficient animal treatment, in addition to food safety problems, could be the negative effects of the consumption of contaminated feed for long periods of time. Current legislation set maximum limits for coccidiostats and establishes that before 2023 maximum limits for antimicrobials must be set; it is important to have reliable methods to control the presence of these type substances in feed.

Based on this, the present research works presents four confirmatory methods to identify and quantify antiparasitic and antimicrobial agents in feed of different animal species by HPLC-MS/MS. These methods were validated according to the current legislation and subsequently applied in samples obtained from farms and feed producers, to investigate the presence of residues of sulfonamides, tetracyclines, fenicols and coccidiostatics due to cross contamination. Fenicols were only detected in feed from feed producers (3%), sulfonamides, tetracyclines and coccidiostats were measured in feed obtained from farms and feed producers. Sulfonamides were the group of samples (39% in farms and 36% in factories), this high frequency of detection could be due to a lower control of the presence of these substances in feed.

**Key words:** Feed, cross contamination, antimicrobials, coccidiostatics, HPLC-MS/MS.



# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1. EL PIENSO**

Desde el punto de vista económico, la alimentación de los animales productores de alimentos constituye el principal coste de las explotaciones ganaderas, pudiendo llegar a suponer entre el 60% y el 70%, por lo que se han empleado muchos esfuerzos en el conocimiento de las necesidades de crecimiento de cada especie y en la optimización de las raciones para obtener los mejores rendimientos. Por lo tanto, es lógico pensar que la gran variabilidad en la composición de los alimentos para animales viene dada por los distintos objetivos que se pretenden alcanzar en la explotación y que dependen de la especie animal, edad, sexo, si es monogástrico o poligástrico, estado fisiológico en que se encuentra (lactancia, crecimiento, ordeño, engorde, etc.) y el tipo de producción que se pretende obtener de ella (leche, huevos, carne).

La normativa europea (Reglamento 178/2002) define el pienso como “cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, destinado a la alimentación por vía oral de los animales, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente como si no”. Por otro lado, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) define el pienso compuesto como mezcla de productos de origen vegetal o animal en su estado natural (frescos o conservados), productos derivados de un procesamiento industrial o sustancias

orgánicas o inorgánicas, contengan o no aditivos, que constituyen un alimento completo para suministro oral en la alimentación animal (FAO, 2003).

En la actualidad se dispone de piensos específicos para cada categoría animal, que varía no sólo con la especie, sino también con la edad, sexo o fines productivos, factores que originan unas necesidades nutricionales concretas. Por ejemplo, dentro del caso de piensos para aves productoras de alimentos se pueden encontrar piensos para pollos de carne, para pollitas de cría-recría, para gallinas ponedoras, gallinas reproductoras, pavos de engorde, pavos reproductores y otro tipo de aves.

### 1.1.1. Tipos de piensos que se emplean en producción animal

#### 1.1.1.1. Pienso completos y complementarios

Existen piensos que se utilizan como único alimento, ya que tienen una composición que cubre todas las necesidades nutricionales del animal siendo suficiente una ración diaria, a estos piensos se les denomina **piensos completos** (Reglamento 767/2009). Asimismo, el Reglamento define los piensos **complementarios**, que son piensos que tienen un contenido elevado de determinadas sustancias pero que, debido a su composición, su aportación no completa una ración diaria a menos que se utilice en combinación con otro pienso. El **pienso compuesto** se define como mezcla de al menos dos materias primas para piensos, tanto si contienen aditivos para piensos como si no, para la alimentación de los animales por vía oral en forma de pienso completo o complementario.

Además de los piensos completos y complementarios, en producción animal también se emplean piensos para la administración de determinados medicamentos veterinarios (**piensos medicamentosos**) o aditivos (**piensos aditivados**). Estos deben

cumplir unos criterios específicos que pasan a detallarse a continuación.

#### 1.1.1.2. Piensos medicamentosos

El Real Decreto 1246/2008 define **medicamento veterinario** como toda sustancia o combinación de sustancias que se presenta como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales, o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico clínico veterinario.

Esta definición es necesaria, ya que el empleo de medicamentos veterinarios es inevitable a veces en la producción animal para tratar y/o prevenir enfermedades. Existen diversas vías de tratamiento terapéutico para los animales, tales como la vía oral (pienso, agua, grageas, cápsulas), la vía rectal (supositorios), la vía parenteral (inyectables) y la vía tópica (sobre la piel). Cuando se utiliza el pienso para administrar un determinado medicamento, a este pienso se le denomina **pienso medicamentoso**. Según el Real Decreto 1409/2009 un pienso medicamentoso es toda mezcla de premezcla(s) medicamentosa(s) y de pienso(s) preparada previamente a su comercialización, y destinada a ser administrada a los animales sin transformación, en razón de las propiedades curativas, preventivas o de otras propiedades de la(s) premezcla(s). Asimismo, define la **premezcla para piensos medicamentosos o premezcla medicamentosa** como todo medicamento veterinario fabricado industrialmente con vistas a la elaboración de piensos medicamentosos, y autorizado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios o por la Comisión Europea de conformidad al Reglamento 726/2004, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos y Productos Sanitarios.

La preparación y administración de las premezclas medicamentosas está regulada por ley, de forma que únicamente se elaborarán mediante prescripción del veterinario, que expedirá una receta. Sólo se permite la elaboración de los piensos con premezclas medicamentosas en instalaciones que cumplen condiciones específicas en cuanto a capacidad, cualificación del personal y condiciones de manejo.

Una ventaja fundamental del pienso medicamentoso es que asegura la homogeneidad y la estabilidad de los medicamentos veterinarios en el pienso. Además, reduce el número de personas que maneja altas concentraciones de estas sustancias.

Debe tenerse en cuenta que sólo está permitida la elaboración de piensos medicamentosos con premezclas medicamentosas autorizadas de acuerdo con lo dispuesto en el Real Decreto 1246/2008. En España pueden elaborarse estos piensos con premezclas no autorizadas aquí pero sí en el Estado miembro de destino, con destino a dicho Estado exclusivamente, ello conlleva comunicación previa en tal sentido a la autoridad competente que se encargará de efectuar un control sobre dicha elaboración (Real Decreto 1409/2009).

En lo que se refiere a las explotaciones, el pienso medicamentoso deberá ir acompañado de la receta veterinaria. Este tipo de piensos sólo se podrán entregar al ganadero o persona que tenga en su poder los animales, previa presentación de la receta veterinaria correspondiente. Además, en el caso de animales productores de alimentos destinados a consumo humano los piensos no deberán sobrepasar las cantidades prescritas para el tratamiento con arreglo a la prescripción veterinaria, que autorizará el suministro de la cantidad necesaria como máximo para un mes. Asimismo, cuando los piensos medicamentosos se administren a animales productores de alimentos destinados al consumo humano, el titular de la explotación ganadera o la persona en cuyo poder se encuentren los animales en cuestión tendrá la responsabilidad de garantizar que el animal tratado no sea sacrificado con destino al consumo humano hasta expirar el plazo de espera establecido y que los productos de un animal tratado no se



destinen al consumo humano antes de dicha expiración (Real Decreto 1409/2009).

A todo lo anterior hay que añadir que el Reglamento 2019/4 presenta disposiciones específicas sobre **piensos medicamentosos** y los productos intermedios. En este Reglamento se define pienso medicamentoso como pienso listo para alimentar directamente a los animales sin más transformación, consistente en una mezcla homogénea de uno o varios medicamentos veterinarios o productos intermedios con materias primas para piensos o pienso compuesto. Asimismo, el Reglamento define **producto intermedio** como el pienso no listo para alimentar directamente a los animales sin más transformación, consistente en una mezcla homogénea de uno o varios medicamentos veterinarios con materias primas para piensos o pienso compuesto, y destinado exclusivamente a la fabricación de piensos medicamentosos. El Reglamento introduce una nueva definición de pienso, que son los **piensos no destinatarios**, éstos son piensos, medicamentosos o no, que no está previsto que contengan un principio activo específico. Además, dicho Reglamento también define la contaminación cruzada como contaminación de un pienso no destinatario con un principio activo originada por el uso previo de instalaciones o equipos.

El nuevo Reglamento sobre pienso medicamentoso establece que las empresas de piensos que fabriquen, almacenen, transporten o comercialicen piensos medicamentosos o productos intermedios aplicarán medidas de conformidad con el artículo 4, en el que se especifican todos los requisitos para evitar la contaminación cruzada. Asimismo, estipula que para antes del año 2023 se van a establecer niveles máximos específicos de contaminación cruzada para determinados antimicrobianos (Tabla 1.1) en piensos no destinatarios y métodos de análisis de principios activos en piensos.

**Tabla 1.1. Lista de principios activos antimicrobianos para los que se establecerán LM, como consecuencia de contaminación cruzada**

| PRINCIPIO ACTIVO | PRINCIPIO ACTIVO |
|------------------|------------------|
| Amoxicilina      | Tetraciclina     |
| Amprolio         | Oxitetraciclina  |
| Apramicina       | Ácido oxolínico  |
| Clortetraciclina | Paranomicina     |
| Colistina        | Penicilina V     |
| Doxiciclina      | Tiamulina        |
| Florfenicol      | Tiamfenicol      |
| Flumequina       | Tilmicosina      |
| Lincomicina      | Trimetoprim      |
| Neomicina        | Tilosina         |
| Espectinomicina  | Valnemulina      |
| Sulfonamidas     | Tilvalosina      |

Fuente: Reglamento 2019/4

### 1.1.1.3. Piensos con aditivos

Se habla de **piensos con aditivos** cuando a los piensos se les añaden aditivos en forma de sustancias, microorganismos y preparados que presentan una función reconocida y que están autorizados según el Reglamento 1831/2003 sobre los aditivos en alimentación animal y publicados en el DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea) para poder ser comercializados. Los aditivos deberán cumplir las siguientes funciones:

1. Influir positivamente en las características del pienso.
2. Influir positivamente en las características de los productos animales.

3. Influir favorablemente en el color de los pájaros y peces ornamentales.
4. Satisfacer las necesidades alimenticias de los animales.
5. Influir positivamente en las repercusiones medioambientales de la producción animal.
6. Influir positivamente en la producción, la actividad o el bienestar de los animales, especialmente actuando en la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los piensos, o
7. Tener un efecto coccidiostático o histomonostático. Los antibióticos distintos de los aditivos con efecto coccidiostático o histomonostático no están autorizados como aditivos para alimentación animal.

Es común que los aditivos no se administren directamente a los animales en el pienso, sino que se haga en forma de **premezclas de aditivos**, que se definen como mezclas de aditivos para alimentación animal que pueden contener además, materias primas para piensos o agua utilizados como soporte (Reglamento 1831/2003). En base al Reglamento 1831/2003 los aditivos para alimentación animal se agrupan en diferentes categorías:

1. **Aditivos tecnológicos**, son cualquier sustancia añadida a los piensos con fines tecnológicos. Incluye conservantes, antioxidantes, emulgentes, estabilizantes, espesantes, gelificantes, ligantes, sustancias para el control de la contaminación por radionucleidos, antiaglomerantes, reguladores de la acidez, aditivos para ensilaje, desnaturalizantes.
2. **Aditivos organolépticos**, son cualquier sustancia que añadida a los piensos, mejora o modifica las propiedades organolépticas de éstos o las características visuales de los alimentos de origen animal. Se incluyen los colorantes y aromatizantes.

3. **Aditivos nutricionales** que incluye los siguientes grupos funcionales:

- a) vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas de efecto análogo.
- b) oligoelementos o compuestos de oligoelementos.
- c) aminoácidos, sus sales y análogos.
- d) urea y sus derivados.

4. **Aditivos zootécnicos**, son cualquier aditivo utilizado para influir positivamente en la productividad de los animales sanos o en el medio ambiente. Se incluyen los siguientes grupos:

- a) digestivos: sustancias que, suministradas a los animales, facilitan la digestión de los alimentos ingeridos, actuando sobre determinadas materias primas para piensos.
- b) estabilizadores de la flora intestinal: microorganismos u otras sustancias definidas químicamente que, suministradas a los animales, tienen un efecto positivo para la flora intestinal.
- c) sustancias que influyen positivamente en el medio ambiente.
- d) otros aditivos zootécnicos.

#### 1.1.1.4. Pienso de producción ecológica

Por otra parte, existen **pienso de producción ecológica**, que son pienso en cuya fabricación sólo se contempla el uso de métodos en todas las etapas de la producción, preparación y distribución, conformes a las normas establecidas en el Reglamento 834/2007. Además de los principios generales que cita este Reglamento, también contempla de manera específica para la producción de pienso ecológicos los siguientes principios:

1. La producción de piensos ecológicos a partir de materias primas ecológicas para la alimentación animal, salvo cuando en el mercado no se disponga de materias primas para la alimentación animal en su variante ecológica.
2. La restricción al mínimo de los aditivos para la alimentación animal, así como de coadyuvantes tecnológicos y permitirlo sólo en caso de necesidad tecnológica o zootécnica esencial o por motivos concretos de nutrición.
3. La exclusión de las sustancias y los métodos de transformación que puedan inducir a error sobre la verdadera naturaleza del producto.
4. La transformación de los piensos con cuidado, preferiblemente utilizando métodos biológicos, mecánicos y físicos.

Además, el Reglamento 834/2007 prohíbe específicamente utilizar organismos genéticamente modificados y radiaciones ionizantes en la producción ecológica.

## **1.2. LA ELABORACIÓN DEL PIENSO**

### **1.2.1. Principales etapas en la elaboración del pienso**

De forma genérica, el proceso de fabricación de piensos podría resumirse en las etapas que se reflejan en la Figura 1.1. Según queda reflejado, pueden citarse las siguientes etapas:

1. Recepción, descarga y almacenamiento de materias primas. Las distintas materias primas que llegan a fábrica lo hacen normalmente en camiones. En el momento de la descarga se comprueba visualmente el buen estado de las materias primas y se toman muestras representativas para analizar diversos parámetros

nutricionales y de calidad. Se guarda además una réplica de las muestras por si fuera necesario repetir algún análisis. Las materias primas se descargan y se almacenan en los silos y lugares acondicionados al efecto.

2. Molienda. Las materias primas pueden ser trituradas en molinos para obtener un tamaño de grano de 2 a 10 mm, lo que permitirá un mayor aprovechamiento de los nutrientes.
3. Dosificación. En esta etapa se pesa cada materia prima según las especificaciones de cada tipo de fabricación y se incorpora a la mezcla.
4. Mezcla. El proceso de mezcla es fundamental en la elaboración de piensos compuestos. Tiene por objeto homogeneizar el conjunto de ingredientes y materias primas que integran el pienso. A las materias primas molidas se les puede inyectar materias primas líquidas y se adicionan minerales, vitaminas, aditivos... Normalmente, se utiliza una mezcladora en la que se añaden los ingredientes necesarios y se homogenizan durante un tiempo de 3 a 5 minutos.
5. Granulación. Dependiendo de la especie animal de destino, el pienso puede tener forma de gránulos o pellets. El proceso de granulación incrementa la digestibilidad del pienso. Contempla procesos tales como la inyección de vapor de agua, la extrusión, etc.
6. Almacenamiento del producto final y expedición. Una vez terminado el proceso de producción del pienso compuesto, éste se puede almacenar en silos (a granel) o en sacos o bolsas de diversa capacidad. De esta manera, el pienso está listo para su expedición en camiones adecuados, con destino a las explotaciones ganaderas.

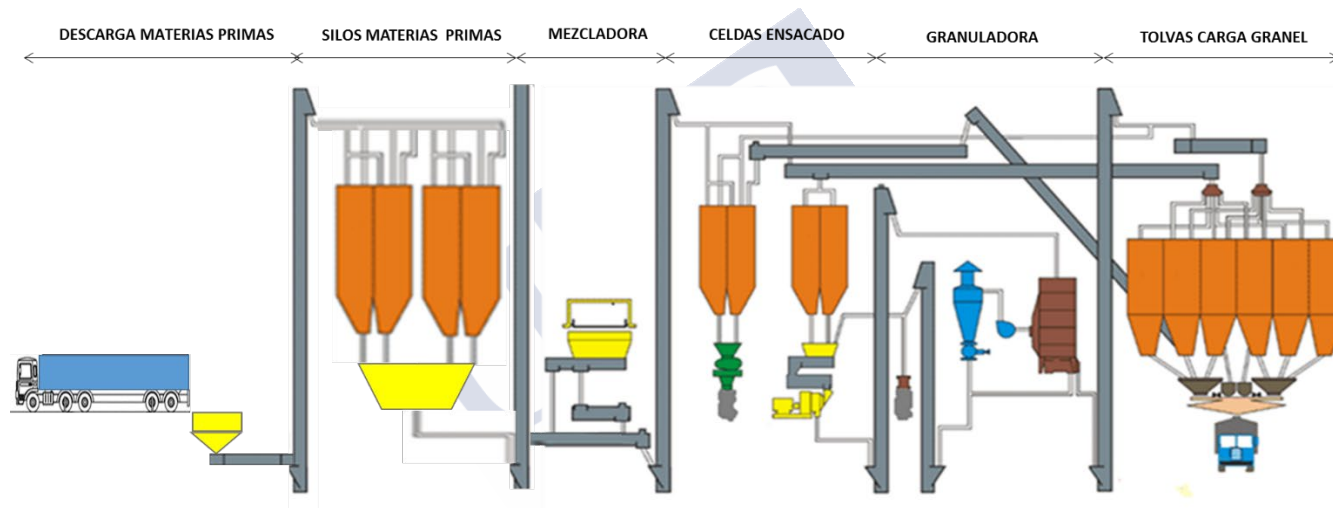


Figura 1.1. Diagrama general de fabricación de piensos

### 1.2.2. Materias primas empleadas en la elaboración de piensos

Cada pienso debe aportar en cada fase de crecimiento del animal los nutrientes necesarios para su desarrollo (agua, minerales, hidratos de carbono, proteína y compuestos nitrogenados, grasa y vitaminas), todo ello, sin afectar, en la medida de lo posible, a la palatabilidad y la aceptación del producto. Por ello, los alimentos para animales pueden clasificarse atendiendo a su contenido general de nutrientes de la manera siguiente:

- a) Alimentos energéticos. Predomina la cantidad de energía aportada sobre la cantidad de *proteína*.
- b) Alimentos proteicos. Predomina la cantidad de proteína aportada sobre la cantidad de energía.
- c) Alimentos equilibrados. Suelen ser piensos destinados a mejorar la producción. Son mezclas de concentrados, por lo que completan todos los requerimientos nutricionales, a excepción de los rumiantes, que precisan complementarse con una base forrajera.
- d) Alimentos minerales y correctores. No aportan energía ni proteína, pero sí los minerales necesarios para el equilibrio de las distintas dietas del ganado. También se incluyen productos que contienen vitaminas o aminoácidos esenciales para corregir deficiencias en la ración.

El número de ingredientes utilizados para la alimentación del ganado es muy elevado y varía en los diferentes países (FEDNA, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 2010). Según el Reglamento 2017/1017 las materias primas que pueden emplearse en la elaboración de piensos destinados a la producción animal es la siguiente:



1. Granos de cereales y sus productos derivados. Cebada y derivados. Malta, raicillas de malta. Maíz y derivados. Mijo. Avena y derivados. Granos de quinua de extracción. Arroz y derivados. Centeno y derivados. Sorgo y derivados. Espelta y derivados. Triticale. Trigo y derivados. Harina de cereal, concentrado de proteína de cereales, fracción de cribado de granos de cereal, germen de cereal, jarabe de vinazas de cereales, residuos de destilería, etc.
2. Semillas oleaginosas, frutos oleaginosos y sus productos derivados. Torta de prensado de babasú, semilla de camelina y derivados, cascarilla de cacao, cáscara de cacao, harinas y tortas de diversas especies, aceites y grasas vegetales, lecitinas brutas, semilla de cáñamo, semillas de adormidera.
3. Semillas de leguminosas y sus productos derivados. Judías tostadas, concentrado proteínico de judías, algarroba y derivados, garbanzos, yeros, semillas de fenogreco, harina de guar, harina de germen de guar, haboncillos y derivados, lentejas, cáscaras de lentejas, altramuza y derivados, frijoles chinos, guisante y derivados, vezas, almorta, alverja.
4. Tubérculos, raíces y sus productos derivados. Remolacha azucarera y derivados, zanahoria y derivados, achicoria y derivados, inulina, jarabe de oligofructosa, oligofructosa seca, ajo seco, mandioca, mandioca seca, cebolla, patata y derivados, batata, boniato, aguaturma, pataca.
5. Otras semillas y frutos y sus productos derivados. Bellota, almendra, semilla de anís, manzana, semilla de remolacha azucarera, alforfón y derivados, semilla de lombarda, semilla de alpiste, semilla de alcaravea, castañas partidas, pulpa de cítricos, semilla de trébol rojo, cascarillas de café, semilla de aciano, semilla de pepino, semilla de ciprés, dátil, semilla de dátil, semillas de hinojo, higo, huesos de frutas, pulpa de fruta, mastuerzo, semillas de gramíneas, uva y derivados, avellana, torta de prensado de avellana, pectina, semilla de perilla,

piñones, pistacho, semillas de plantago, semilla de rábano, semilla de espinacas, semilla de cardo, pulpa de tomate, semilla de milenrama, tortas de prensado diversas.

6. Forrajes y forrajes groseros y sus productos derivados. Hojas de remolacha y de acelgas, plantas de cereales, paja de cereales, paja de cereales tratada, harina de trébol, harina de forraje, hierba de alfalfa desecada, hierba secada a alta temperatura, hierba, leguminosas, harina de cáñamo, fibra de cáñamo, paja de haboncillos, paja de semillas de lino, alfalfa y derivados, ensilado de maíz, paja de guisantes, paja de colza.
7. Otras plantas, algas y sus productos derivados. Algas y derivados, cortezas, flores secas, brécol seco, melazas y otros productos de caña, hojas secas, lignocelulosa, polvo de celulosa, raíz de regaliz, menta, espinacas secas, yuca de Mojave, zumo o jugo de yuca, carbón vegetal, madera, harina de duraznillo blanco.
8. Productos lácteos y sus productos derivados. Mantequilla y productos derivados, mazada o mazada en polvo, caseína, caseinato, queso y productos derivados, calostro, subproductos lácteos, productos lácteos fermentados, lactosa, leche o leche en polvo, leche desnatada, materias grasas de la leche, proteína de leche en polvo, leche condensada y evaporada y sus productos derivados, permeado de leche, retenido de leche, lactosuero con distintas composiciones.
9. Productos de animales terrestres y sus productos derivados. Subproductos animales, grasa animal, subproductos de la apicultura, proteína animal transformada, proteínas derivadas de la transformación de gelatina, proteínas animales hidrolizadas, harina de sangre, productos sanguíneos, reciclado de residuos de cocina, colágeno, harina de plumas, gelatina, chicharrones, productos de origen animal, huevos y ovoproduitos, cáscaras de huevo secas, invertebrados terrestres.

10. Pescados y otros animales acuáticos y sus productos derivados. Invertebrados acuáticos, subproductos de animales acuáticos, harina de crustáceos, pescado y derivados, productos de krill, harinas de anélidos marinos, de zooplancton marino, de moluscos, de calamar, estrella de mar.
11. Minerales y sus productos derivados. Calcio en diversas composiciones, magnesio en diversas composiciones, fosfatos, harina de huesos desgelatinizados, ceniza de huesos, cloruros carbonatos, sales, flor de azufre, atapulgita, cuarzo, cristobalita, sulfatos, sales, lactato de amonio, acetato de amonio, polvo de carburo de silicio, arcilla roja.
12. Productos y subproductos obtenidos por microorganismos fermentadores que se inactivan tras el proceso de fermentación, de modo que no quedan microorganismos vivos. Derivados de *Methylophilus methylotrophus*, *Methylococcus capsulatus*, *Alcaligenes acidovarans*, *Bacillus brevis* y *Bacillus firmus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, ricos en proteínas, levaduras, ensilaje de micelio derivado de la elaboración de penicilina, levaduras de la elaboración de biodiesel, derivados de *Lactobacillus* spp., *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, ricos en proteínas, productos de levaduras, vinazas, subproductos de la elaboración de ácido L-glutámico, subproductos de la elaboración de monoclóhidrato de L-lisina con *Brevibacterium lactofermentum*, subproductos de la elaboración de aminoácidos con *Corynebacterium glutamicum* o *Escherichia coli*, subproductos de elaboración de enzimas con *Aspergillus niger*, polihidroxibutirato obtenido de la fermentación con *Ralstonia eutropha*.
13. Varios. Productos de panadería y, productos de la elaboración de cereales para desayunos, productos de la industria de la confitería, productos de la industria de la heladería, productos y subproductos de la transformación de frutas y hortalizas frescas, productos de la transformación de plantas, productos

de la transformación de especias y condimentos, productos de la transformación de hierbas aromáticas, productos de la industria de transformación de la patata, productos y subproductos de la elaboración de salsas, productos y subproductos de la industria de los aperitivos salados, productos de la industria de los alimentos preparados, subproductos vegetales de la producción de bebidas alcohólicas, cervezas para piensos, bebidas aromatizadas con aromas dulces, jarabe de frutas, jarabes aromatizados con aromas dulces, azúcares, polialcoholes, aceites ácidos resultantes del refinado químico, ácidos grasos, sales, etc.

### **1.3. ANTIMICROBIANOS Y ANTIPARASITARIOS UTILIZADOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

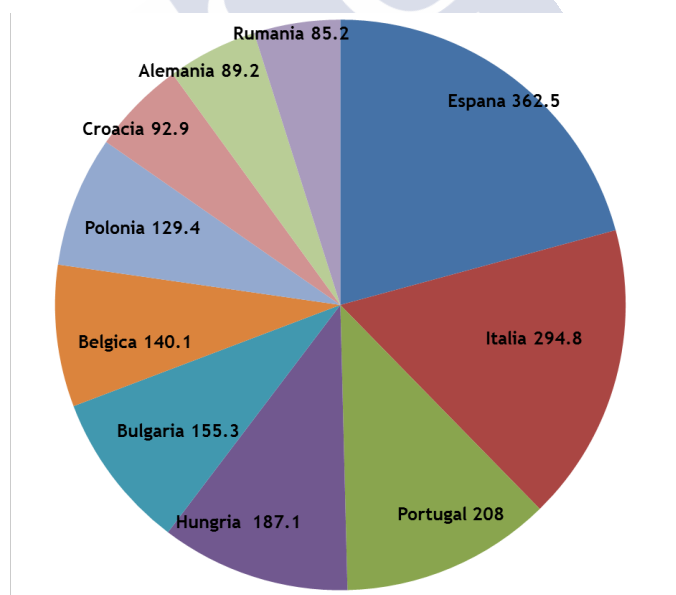
Según la Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios, en España hay 2368 medicamentos autorizados y 1110 principios activos para uso veterinario. La venta de este tipo de productos en Europa supuso en 2017 unos 5,99 billones de euros, el 29% del mercado global. Mientras que el 47% se destinó a producción ganadera, el 53% de las ventas fue para animales de compañía. Es importante resaltar que la industria farmacéutica veterinaria representa tan solo un 3% del volumen que representa la industria farmacéutica humana (Animalhealth Europe, 2018).

Según datos de la industria farmacéutica europea, los antimicrobianos y antiparasitarios son uno de los grupos terapéuticos más empleados en la producción animal. Asimismo, las fórmulas terapéuticas más vendidas entre 2012 y 2017 fueron vacunas (30%), agentes antiparasitarios (30%), productos de uso tópico (6%), antimicrobianos (13%) y otros tipos de productos (20%).

A continuación se procede a describir los grupos de antimicrobianos y antiparasitarios que han sido objeto de estudio en este trabajo de investigación.

### 1.3.1. Antimicrobianos

Los **antimicrobianos** son sustancias producidas sintética o naturalmente que se utilizan para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos, entre ellos, bacterias, virus, hongos y parásitos, en particular protozoos (Reglamento 1831/2003). En base a los datos publicados por ESVAC (del inglés European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) referidos a los años 2015 y 2016 y tal como se observa en la Figura 1.2, España se situaba a la cabeza de Europa en ventas absolutas de antimicrobianos con un total de 362,5 mg/PCU (miligramos por Unidad de Corrección de la Población) de antimicrobianos vendidos, el 13% de total de la UE (2726,54 mg/PCU). Le sigue Italia (295 mg/PCU), Portugal (208 mg/PCU) y Hungría (187 mg/PCU) (ESVAC, 2018). La Figura 1.2 muestra los 10 países de la UE que más ventas absolutas de antimicrobianos han comunicado en medicina veterinaria.

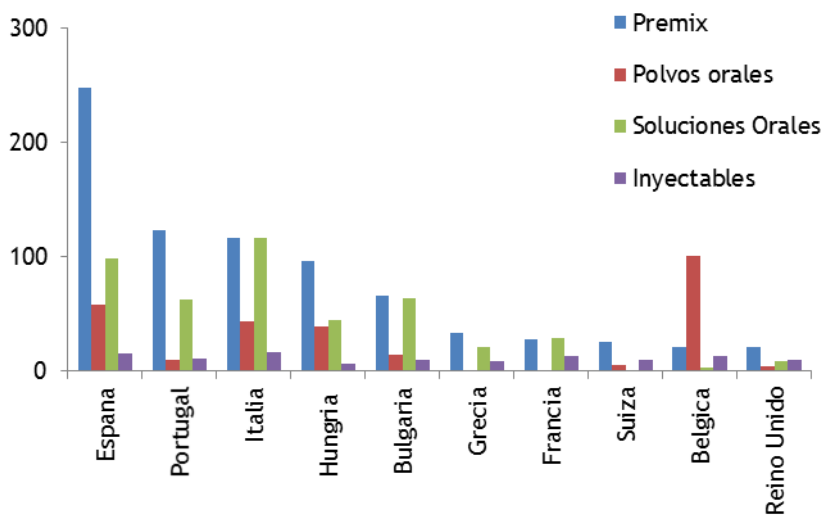


Fuente: ESVAC (2018)

Figura 1.2. Ventas de antimicrobianos (mg/PCU) en los diez países de la UE con mayor volumen declarado

El informe ESVAC recopila datos de ventas de antimicrobianos de 30 países. Si se comparan los datos por formulación terapéutica, las premezclas medicamentosas representaron el 40%, seguidas de soluciones orales (37,4%) y polvos orales (11,9%).

Tal y como se puede observar en la Figura 1.3 estas proporciones no se mantienen en todos los países de la UE, España es el país en el que más premezclas medicamentosas se vendieron. De hecho, los datos para España fueron, 57% de venta de premezclas medicamentosas, el 24% para soluciones orales, 12% de polvos orales y 4% de inyectables (Figura 1.3).

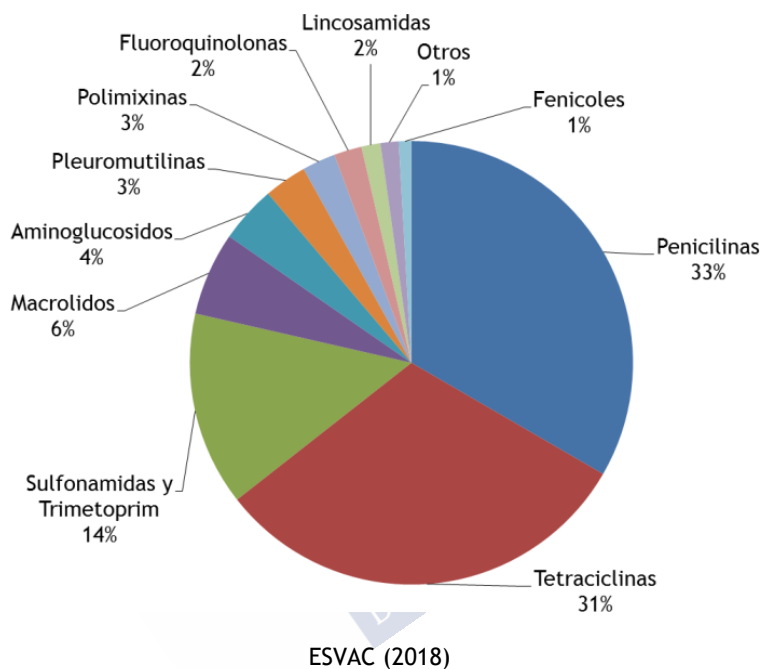


Fuente: ESVAC (2018)

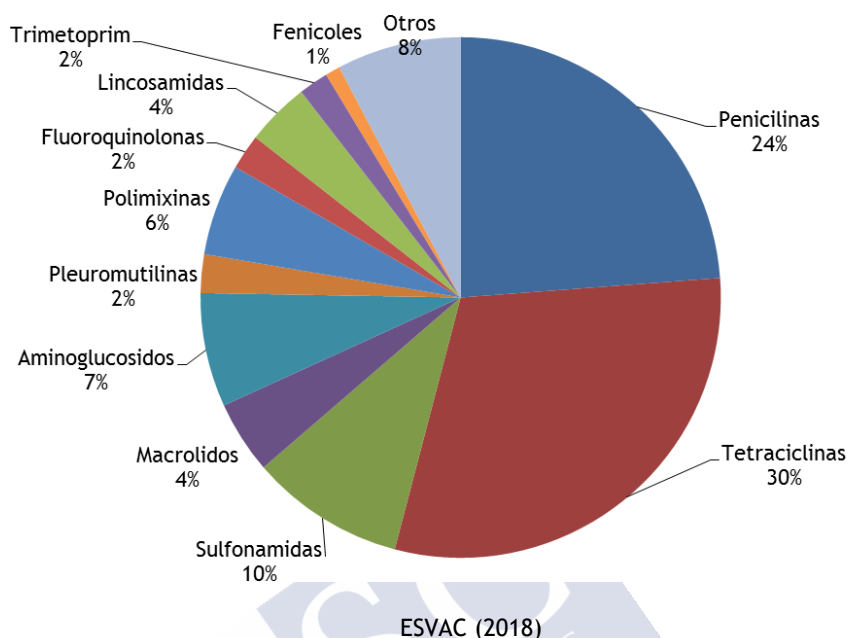
**Figura 1.3. Fórmulas terapéuticas de agentes antimicrobianos (mg/PCU) en los diez países con mayor venta de premezclas, durante el año 2016**

En el informe ESVAC también aparecen datos de los diferentes grupos de antimicrobianos que se emplean en medicina veterinaria, siendo el grupo de las penicilinas el más vendido (33%), seguido de las tetraciclinas (31%), sulfonamidas y trimetoprim (14%) macrólidos (6%), aminoglucósidos (4%), pleuromutilinas (3%), polimixinas (3%),

fluoroquinolonas (2%), lincosaminas (2%), fenicoles (1%) y otros. (Figura 1.4). A diferencia de las formulaciones, las proporciones de ventas de los diferentes grupos terapéuticos se mantienen en los diferentes países de la UE. La Figura 1.5 muestra las ventas de los grupos terapéuticos en España durante el año 2016.



**Figura 1.4. Porcentaje de ventas de los principales grupos de antimicrobianos en Europa en 2016**



**Figura 1.5. Porcentaje de ventas de los principales grupos de antimicrobianos en España en 2016**

Actualmente, existe una campaña de concienciación a nivel mundial, que a través del gobierno español está difundida por medio del Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos, para minimizar el uso de estas sustancias y con ello, sus efectos sobre la salud humana, animal y el medio ambiente, así como los efectos económicos causados por el abuso de estas sustancias (Ministerio de Sanidad y Consumo y Bienestar Social, 2018).

A continuación, se describen las características básicas de los antimicrobianos que han sido objeto de estudio en esta tesis doctoral.

#### 1.3.1.1. Tetraciclinas

Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales y derivados semisintéticos de diferentes especies de *Streptomyces* spp.



que actúan inhibiendo la síntesis proteica en las bacterias. Como se observa en la Figura 1.6, todas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal constituida por cuatro anillos fusionados (Pérez-Trallero y col., 2003).

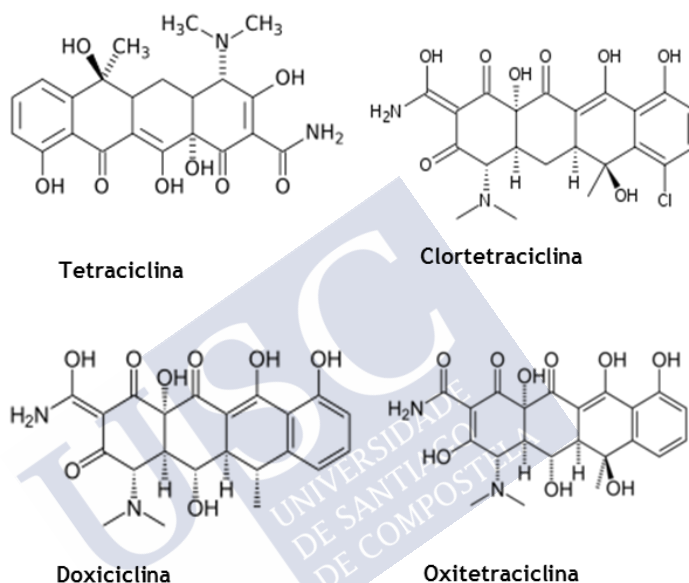


Figura 1.6. Estructura de las tetraciclinas utilizadas en piensos medicados

### 1.3.1.2. Sulfonamidas y trimetoprim

Las sulfonamidas son antimicrobianos sintéticos, bacteriostáticos, de amplio espectro, derivan de la sulfanilamida y su estructura es similar al ácido paraaminobenzoico (Figura 1.7), (Pérez-Trallero y col., 2003). Actúan inhibiendo la síntesis de ácido fólico, el cual es necesario para la síntesis del ácido tetrahidrofólico, que se utiliza a su vez para la obtención de purinas y ciertos aminoácidos esenciales para la producción de ácidos nucleicos. A veces, se administran

sulfonamidas combinadas con el trimetoprim, ya que el trimetoprim es un agente que actúa como antagonista del ácido fólico, bloqueando el paso del ácido fólico a ácido folínico por inhibición de la dihidrofolato-reductasa (Ausina-Ruíz y col., 2006).

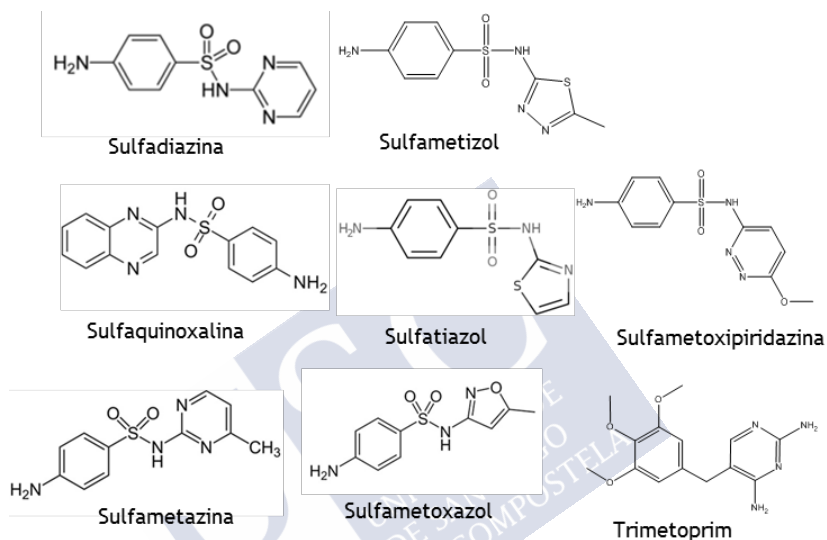


Figura 1.7. Estructura de las sulfonamidas comúnmente utilizadas y del trimetoprim

### 1.3.1.3. Fenicoles

Son un grupo de antibióticos cuya estructura deriva del ácido dicloroacético y que se usan en menor medida que todos los anteriores. A este grupo pertenece el cloranfenicol, cuyo uso está prohibido en la producción animal dentro de la Unión Europea por la gravedad de sus reacciones adversas. Sin embargo, el tianfenicol y florfenicol están permitidos y su administración es frecuente a través

de piensos medicados. Tanto tianfenicol como florfenicol están contemplados en el Reglamento 2019/4/CE.

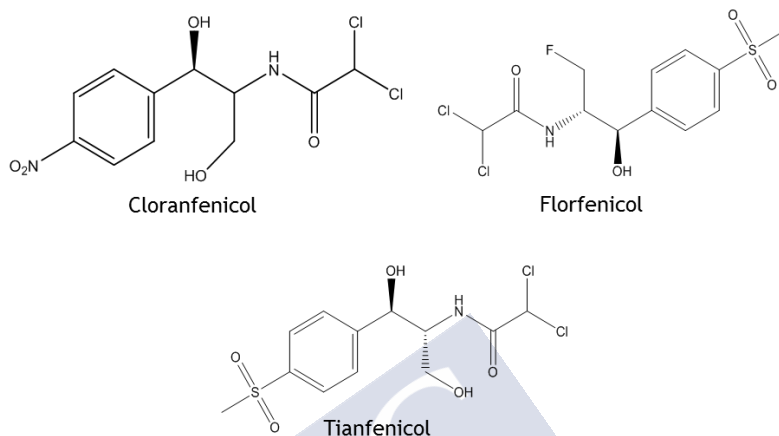


Figura 1.8. Estructura del cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol

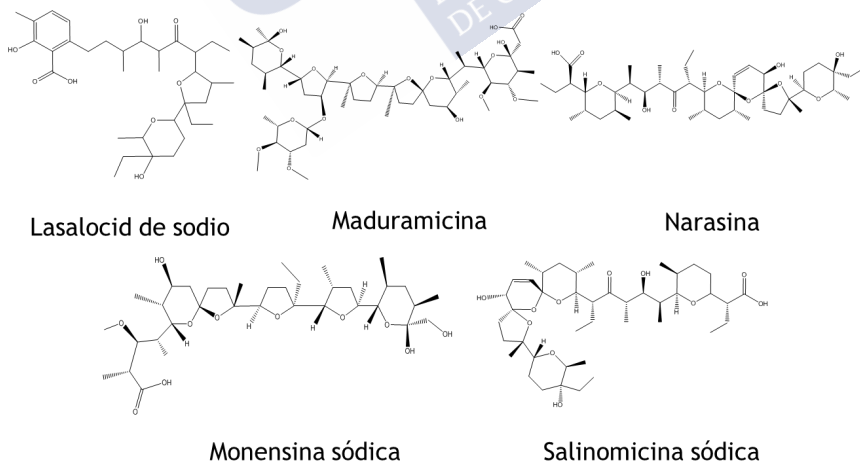
### 1.3.2. Agentes antiparasitarios: coccidiostáticos e histomonóstatos

El grupo de los coccidiostáticos y los histomonóstatos reúne a sustancias químicas que se obtienen por síntesis o a partir de microorganismos que las producen. Estas sustancias tienen la capacidad de inhibir o de destruir los parásitos protozoarios que provocan coccidiosis o histomoniasis en animales de granja. Además, los coccidiostáticos pueden presentar una actividad secundaria y residual frente a la microflora intestinal, aunque son distintos de los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento, cuando estaban autorizados para este uso (Informe del Consejo de la Unión Europea, 2008).

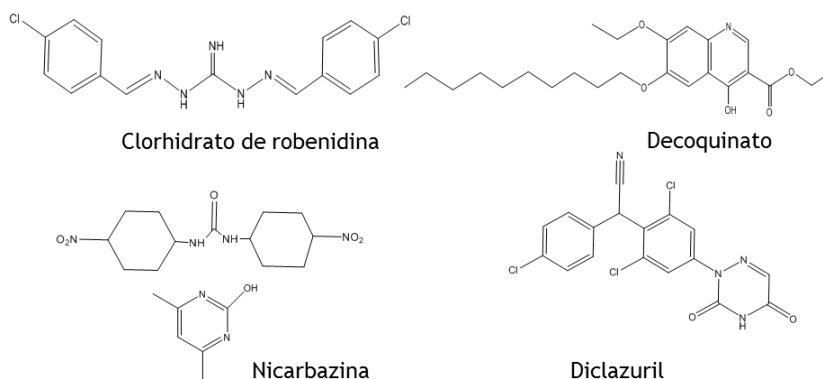
En la actualidad, existen once coccidiostáticos que poseen veintiocho diferentes autorizaciones para distintas especies y categorías y con determinadas condiciones de utilización. Estos productos se pueden agrupar en dos grandes grupos. El primer grupo

contiene los coccidiostáticos ionóforos (sustancias que contienen un grupo poliéter y que se producen mediante fermentación a partir de varias cepas de *Streptomyces* spp. y *Actinomadura* spp.); este grupo incluye las seis sustancias siguientes: lasalocid de sodio, maduramicina de amonio, monensina sódica, narasina, salinomicina de sodio y semduramicina de sodio. Sus estructuras moleculares se representan en la Figura 1.9. En el segundo grupo de coccidiostáticos se incluyen otros cuatro productos sintéticos que no son de naturaleza ionófora: decoquinato (perteneciente al grupo químico de las quinolonas), clorhidrato de robenidina (del grupo químico de las guanidinas), bromhidrato de halofuginona (del grupo químico de las quinazolinonas), diclazuril (del grupo químico de los acetonitrilos de benceno) y nicarbazina (estructuras moleculares representadas en la Figura 1.10).

En cuanto a los histomonóstatos, actualmente, no existe ningún histomonóstato autorizado como aditivo para piensos en la UE. No obstante, existe un mecanismo para autorizarlos en caso de que se presente una solicitud de autorización de un producto con suficientes datos que corroboren que es seguro para el animal, el consumidor y el medio ambiente, así como su eficacia.



**Figura 1.9. Estructura de los coccidiostáticos ionóforos utilizados con más frecuencia en piensos**



**Figura 1.10. Estructura de los coccidiostáticos no ionóforos utilizados más frecuentemente en piensos**

Según aclara el documento “Preguntas y respuestas sobre la aplicación del Real Decreto 1409/2009, de 4 de septiembre, por el que se regula la elaboración, comercialización, uso y control de los piensos medicamentosos (BOE N° 226, 18.09.2009)” aprobado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación el 4 de julio de 2018, los coccidiostáticos e histomonóstatos pueden estar autorizados como aditivos para la alimentación animal en base a las disposiciones del Reglamento 1831/2003 o como medicamentos veterinarios, de acuerdo con la normativa europea y nacional de medicamentos de uso veterinario (Reglamento 726/2004, Real Decreto 1246/2008 y Reglamento 2019/6).

Si se usan los coccidiostáticos para tratar coccidiosis, deberán estar autorizados como medicamentos veterinarios y se aplicarán las disposiciones de la normativa de medicamentos veterinarios y de piensos medicamentosos. Será necesaria entonces la prescripción veterinaria, como por ejemplo, en el caso del decoquinato o del diclazuril para ovino y bovino, que cuentan con una autorización de la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) como medicamento.

Por el contrario, los piensos con coccidiostáticos autorizados como aditivos en el marco del Reglamento 1831/2003 y que están

destinados a las especies y categorías autorizados conforme a los reglamentos específicos de autorización, no se consideran piensos medicamentosos y no es necesaria la prescripción veterinaria para su comercialización.

Las autorizaciones relativas a los aditivos coccidiostáticos figuran en el Registro de la Unión Europea de aditivos para piensos. Además, en la fabricación de piensos con aditivos coccidiostáticos, se tendrán en cuenta las incompatibilidades de especies, representadas en la Figura 1.11. Después de fabricar piensos que contengan los aditivos que figuran en las columnas, se tratará de fabricar piensos donde el aditivo implicado esté autorizado para la especie de destino, respetando siempre el cuadro representado en la figura. Por lo tanto, la interpretación sería la siguiente: no se fabricará un pienso para una especie determinada detrás de un pienso que haya contenido un aditivo determinado, según las casillas marcadas.

| Tipo de pienso       | Lechones | Otros piensos porcino | Pollos carne | Pollos | Ponedoras | Gallinas reproductoras | Pavos | Patos | Pintadas y codorniz de engorde | Codorniz reproducción | Faisán Perdicies | Termeros | Vacas de leche | Ovino | Caprino | Conejo | Caballos | Piensos de retirada y piensos "label" |
|----------------------|----------|-----------------------|--------------|--------|-----------|------------------------|-------|-------|--------------------------------|-----------------------|------------------|----------|----------------|-------|---------|--------|----------|---------------------------------------|
| Aditivo              |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Cobre (>35 mg/Kg)    |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Lasalocid sódico     |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Monensina sódica     |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Salinomicina         |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Narasina+Nicarbazina |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Narasina             |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Maduramicina         |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Diclazuril           |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Robenidina           |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |
| Halofuginona         |          |                       |              |        |           |                        |       |       |                                |                       |                  |          |                |       |         |        |          |                                       |

Fuente: CESFAC (2009)

**Figura 1.11. Cuadro de incompatibilidades de los coccidiostáticos para la fabricación de piensos de las distintas especies de animales de abasto**

## **1.4. LA PRODUCCIÓN DE PIENSO DESDE UNA PERSPECTIVA GLOBAL HASTA UN ENTORNO NACIONAL**

### **1.4.1. Producción global**

La alimentación animal ha experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas tanto en España como a nivel mundial. Este desarrollo ha ido en paralelo al crecimiento del sector ganadero, especialmente en el ámbito de la ganadería intensiva, lo que ha provocado un incremento en la demanda de alimentos para los animales.

Según la encuesta de Alltech referida a los datos de 2016, (Alltech Global Feed Survey, 2017), la producción global de pienso alcanzó 1 billón de toneladas (Tm) en los últimos seis años. La encuesta, que incluye datos de 141 países, muestra que la zona Asia-Pacífico continúa liderando la producción y mantiene un prometedor crecimiento hasta cerca del 5%. Destaca China como principal productor, que se mantiene como líder de esta área con un crecimiento del 19%. Por otra parte, la región de África muestra un rápido aumento productivo, superando el 13%.

En la región de Latinoamérica, Brasil es el mayor productor de piensos, aunque México ha aumentado significativamente su producción. También Oriente Medio mostró el crecimiento más fuerte de todas las regiones, más de un 16%, mientras que la producción de Norteamérica se mantiene relativamente estable.

Hay que resaltar que sólo la producción conjunta de China y EEUU supone más de un tercio de la producción global (35%).

### 1.4.2. Producción en Europa

En comparación con las zonas mencionadas anteriormente, el crecimiento de la zona europea en 2016 para la producción de pienso compuesto es más bajo, se ha estimado en 155 millones de Tm, representando un 16,4 % de la producción global, lo que supone un crecimiento del 0,4% respecto al año anterior (FEFAC, 2017). Esto es debido, entre otros factores, al tumultuoso proceso que la Unión Europea está experimentando con el Brexit y a la reforma de las ayudas a la agricultura. Pero además, otras circunstancias han afectado a la producción de los distintos tipos de piensos para cada especie.

Así, para vacuno, aunque los Países Bajos y Polonia incrementaron su producción en más de un 8%, Francia sufrió la supresión de la cuota láctea, repercutiendo en un descenso de la producción.

En el caso de los piensos para avicultura, la producción se vio afectada por la gripe aviar, particularmente en Francia, con un descenso del 4% de la producción de estos piensos. En conjunto, la producción de piensos para aves se mantiene, siendo el tipo de pienso que se produce en Europa en mayor cantidad.

En relación con la producción de piensos compuestos para cerdos, también se detecta un descenso de la fabricación en 2016, debido a los efectos de la fiebre porcina africana en el Este de Europa y a los bajos precios del mercado de la carne, así como la disponibilidad de los cereales a precios más asequibles.

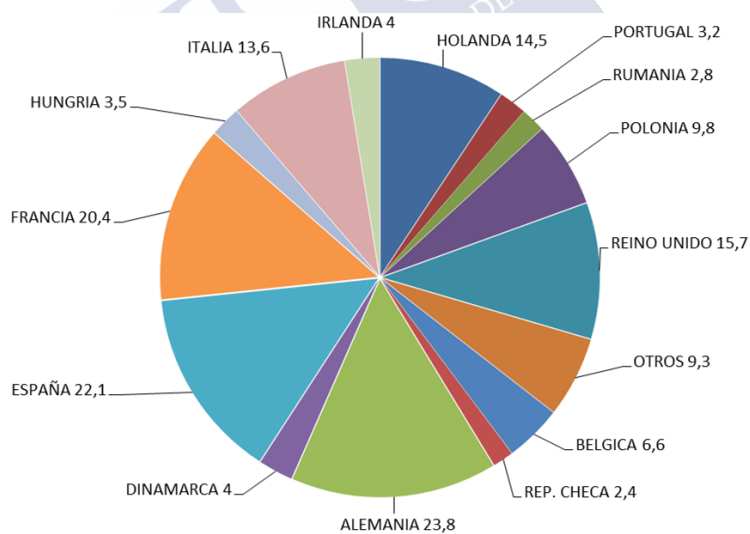
En conjunto, tal y como se aprecia en la Figura 1.12, Alemania es el mayor productor de piensos compuestos en la UE en 2016 con un 23,8%, especialmente en la producción de piensos para vacuno y porcino, España ocupa el segundo lugar (22,1%) y Francia ocupa el tercero (20,4%), siendo Francia el líder en la producción de pienso para aves.



**Tabla 1.2. Volumen de producción de piensos para vacuno, porcino y aves en Europa durante 2016**

| ESPECIE             | MILLONES DE TM |
|---------------------|----------------|
| Pienso para vacuno  | 41,4           |
| Pienso para porcino | 49,4           |
| Pienso para aves    | 53,6           |
| <b>TOTAL</b>        | <b>153,4</b>   |

Fuente: CESFAC (2017)



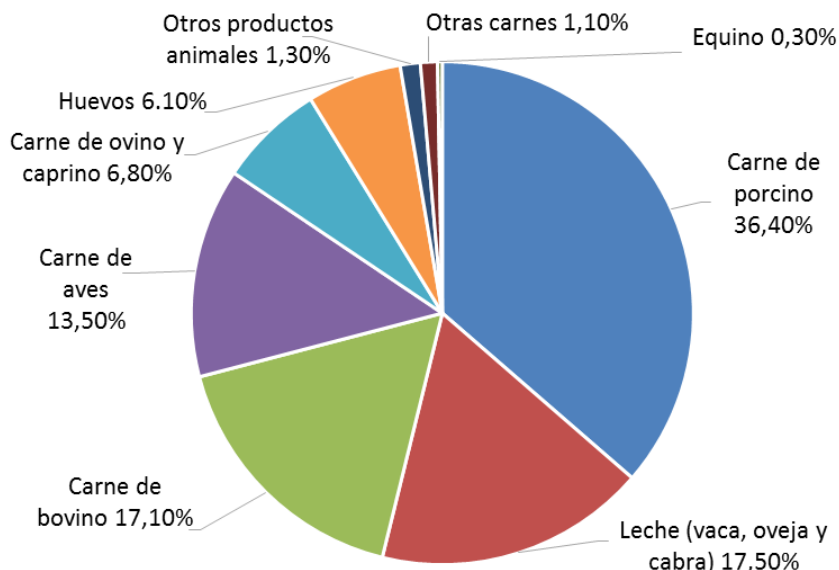
Fuente: FEFAC (2017)

**Figura 1.12. Producción de piensos compuestos (millones de Tm) en los países de la Unión Europea en 2016**

### **1.4.3. La producción de piensos en España**

La producción total de piensos en España alcanzó durante 2016 los 34 029 299 Tm (FEFAC, 2016), lo que significó un aumento de un 8,6% respecto a 2015. En concreto, la producción destinada a animales de abasto sumó 32 947 115 Tm, un 96,8% del total del pienso fabricado. Para otras especies animales (animales de compañía, peletería y otras especies), se declararon 1 082 152 Tm, dato que supera en un 6,9% la cifra de 2015.

El nivel de producción alcanzado en España en el sector de la alimentación animal se explica por el aumento de volumen de producción ganadera. Según datos de 2016 de la Subdirección General de Productos Ganaderos, dentro del conjunto de las especies, el porcino representa el 36,4% (Figura 1.16), situándose España como la cuarta potencia mundial productora de porcino (MAPAMA, 2016). Le sigue el sector avícola, que representa el 19,6%; del cual, el 13,5% corresponde a la producción de carne (España es el segundo productor europeo por detrás de Reino Unido) y el 6,1% corresponde a la producción de huevos. El sector bovino ocupa el 17,1% de la producción total ganadera y el sector lácteo (incluyendo la producción de leche de vaca, cabra y oveja) representa el 17,5%. Le sigue en proporción el sector de carne de ovino y caprino, con un 6,8%.



Fuente: MAPAMA (2017)

**Figura 1.13. Porcentajes de producción ganadera en España en 2016**

La producción agraria en España movió 46 807 millones de euros en 2016, correspondiendo a la producción ganadera 16 377 millones de euros (MAPAMA, 2017). Observando las distintas producciones ganaderas en España, de su posición en Europa se deduce la considerable importancia de la producción de pienso en España. Como se aprecia en la Tabla 1.3 y en coherencia con los datos de producción ganadera, el mayor volumen de fabricación de pienso en España corresponde al sector porcino (15 221 926 Tm), siendo Cataluña la Comunidad Autónoma que lidera la producción, seguida de Aragón. En segundo lugar, destaca la fabricación de piensos para aves (7 231 541 Tm), en la que Andalucía es la Comunidad Autónoma más productiva. En tercer lugar, con datos similares al sector avícola (7 021 315 Tm) se sitúa la producción de pienso para bovino, liderando la producción Galicia (1 260 455 Tm). Para el sector ovino/caprino se produjeron un total de 2 073 201 Tm, siendo Castilla-León la comunidad autónoma que más pienso fabricó

(442 303 Tm). A continuación, se coloca la producción de piensos para conejos (464 611 Tm), para equino (291 411 Tm) y para peces (150 965 Tm). Un dato llamativo de la producción de piensos para peces es que sólo se elaboran en cuatro Comunidades Autónomas (CCAA), y la mayor producción se concentra en Castilla León.



**Tabla 1.3. Datos de producción de piensos (Tm) para las principales especies de abasto, por especie y por comunidad autónoma durante 2016**

| ESPECIE             | Aves             | Porcino           | Bovino           | Ovino/Caprino    | Conejos        | Equino         | Peces          | Multiespecie   | TOTAL             |
|---------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| ANDALUCÍA           | 1 824 314        | 1 623 958         | 1 149 390        | 532 524          | 23 929         | 140 929        | 42             | 11 477         | 5 306 563         |
| ARAGÓN              | 409 262          | 2 964 370         | 641 326          | 148 946          | 67 813         | 20 716         | N/A            | 1050           | 4 253 483         |
| ASTURIAS            | 17 954           | 9175              | 173 600          | 1753             | 27 601         | 2165           | N/A            | 11 054         | 243 302           |
| BALEARES            | 11 004           | 8868              | 8630             | 898              | 380            | 1353           | N/A            | N/A            | 31 133            |
| CANARIAS            | 91 113           | 21 021            | 33 875           | 36 864           | 5191           | 2820           | N/A            | N/A            | 190 884           |
| CANTABRIA           | 4704             | 626               | 210 773          | 852              | 433            | 963            | N/A            | 155            | 218 506           |
| CASTILLA-LA MANCHA  | 618 466          | 583 375           | 639 220          | 281 799          | 7 916          | 9 550          | N/A            | 16 028         | 2 156 354         |
| CASTILLA-LEÓN       | 621 948          | 1 876 086         | 962 735          | 442 303          | 66 973         | 15 495         | 150 889        | 41 355         | 4 177 784         |
| CATALUÑA            | 1 351 320        | 3 580 806         | 759 557          | 57 766           | 96 662         | 24 116         | 2              | 244 838        | 6 115 067         |
| EXTREMADURA         | 282 564          | 827 267           | 266 420          | 188 175          | 1887           | 7193           | 32             | 21             | 1 573 559         |
| GALICIA             | 712 852          | 749 138           | 1 260 455        | 6315             | 66 706         | 8828           | N/A            | 143 960        | 2 948 254         |
| MADRID              | 45 022           | 130 492           | 71 064           | 28 332           | 1828           | 15 383         | N/A            | 5382           | 297 503           |
| MURCIA              | 212 388          | 1 514 301         | 235 394          | 211 008          | 24 398         | 8381           | N/A            | 284            | 2 206 154         |
| NAVARRA             | 314 110          | 508 904           | 337 291          | 72 306           | 2267           | 9265           | N/A            | 1553           | 1 245 696         |
| PAÍS VASCO          | 42 794           | 25 887            | 102 267          | 17 579           | 8678           | 2322           | N/A            | 7268           | 206 795           |
| RIOJA               | 89 795           | 20 802            | 16 598           | 1330             | 13             | 907            | N/A            | N/A            | 129 445           |
| VALENCIA            | 581 931          | 776 850           | 152 720          | 44 451           | 61 936         | 21 025         | N/A            | 7721           | 1 646 634         |
| <b>Total España</b> | <b>7 231 541</b> | <b>15 221 926</b> | <b>7 021 315</b> | <b>2 073 201</b> | <b>464 611</b> | <b>291 411</b> | <b>150 965</b> | <b>492 146</b> | <b>32 947 116</b> |

N/A: No aplica

Fuente: MAPAMA (2017)

Por otra parte, dentro de cada especie animal, las necesidades nutricionales dependen del período productivo, por lo que el pienso suministrado debe adaptarse a estas necesidades específicas, pudiendo clasificarse la producción de piensos según el período productivo al que van destinados. Tal y como aparece reflejado en la Tabla 1.4, que es un ejemplo de que dentro de un mismo sector se producen diferentes tipos para diferentes estados productivos, se puede comprobar que en el año 2016 se fabricaron dentro del sector avícola, piensos para pollos de carne (3 339 374 Tm), gallinas ponedoras (1 911 299 Tm), pavos de engorde (915 064 Tm), pollitas de cría-recría (458 265 Tm), gallinas reproductoras (342 260 Tm), pavos reproductoras (62 029 Tm) y otras aves (202 870 Tm). Asimismo, en el sector porcino se produjeron piensos para cebo (10 605 745 Tm), cerdas reproductoras (2 526 612 Tm), lechones (1 678 157 Tm) y otros (411 413 Tm). Del mismo modo, los piensos fabricados en el sector bovino se destinaron a terneros de engorde (3 037 929 Tm), vacuno lechero (2 996 940 Tm), vacuno extensivo (444 478 Tm), terneros de cría (361 155 Tm), lacto-reemplazantes (36 795 Tm) y otros (144 018 Tm).

**Tabla 1.4. Producción de piensos (Tm) y porcentaje de cada tipo según especie, en España durante 2016**

| <b>FASE O PERÍODO</b>             | <b>TOTAL Tm</b>   | <b>% SOBRE ESPECIE</b> |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------|
| <b>TM DE PIENSOS PARA AVES</b>    |                   |                        |
| Pollos de carne                   | 3 339 374         | 46,18                  |
| Pollitas para cría-recría         | 458 265           | 6,34                   |
| Gallinas ponedoras                | 1 911 299         | 26,43                  |
| Gallinas reproductoras            | 342 260           | 4,74                   |
| Pavos engorde                     | 915 064           | 12,65                  |
| Pavos reproductoras               | 62 029            | 0,86                   |
| Otras aves                        | 202 870           | 2,81                   |
| <b>TOTAL AVICULTURA</b>           | <b>7 231 161</b>  |                        |
| <b>PIENSOS PARA PORCINO</b>       |                   |                        |
| Lechones                          | 1 678 157         | 11,02                  |
| Cebo                              | 10 605 745        | 69,67                  |
| Cerdas reproductoras              | 2 526 612         | 16,60                  |
| Otros                             | 411 413           | 2,70                   |
| <b>TOTAL PORCINO</b>              | <b>15 221 927</b> |                        |
| <b>PIENSOS PARA BOVINO</b>        |                   |                        |
| Lacto-reemplazantes               | 36 795            | 0,52                   |
| Terneros cría                     | 361 155           | 5,14                   |
| Terneros engorde                  | 3 037 029         | 43,27                  |
| Vacuno leche                      | 2 996 940         | 42,68                  |
| Vacuno extensivo                  | 444 478           | 6,33                   |
| Otros                             | 144 018           | 2,05                   |
| <b>TOTAL BOVINO</b>               | <b>7 021 315</b>  |                        |
| <b>PIENSOS PARA OVINO/CAPRINO</b> |                   |                        |
| Engorde                           | 304 397           | 65,52                  |
| Reproductores                     | 129 288           | 27,83                  |
| Otros                             | 30 925            | 6,66                   |
| <b>TOTAL OVINO/CAPRINO</b>        | <b>464 210</b>    |                        |
| <b>PIENSOS PARA ÉQUIDOS</b>       |                   |                        |
| Potros                            | 38 166            | 13,10                  |
| Adultos                           | 235 003           | 80,64                  |
| Otros                             | 18 242            | 6,26                   |
| <b>TOTAL ÉQUIDOS</b>              | <b>291 411</b>    |                        |
| <b>PIENSOS PARA ACUICULTURA</b>   |                   |                        |
| Continental                       | 28 708            | 19,01                  |
| Marino                            | 122 250           | 80,96                  |
| Otros                             | 42                | 0,03                   |
| <b>TOTAL ACUICULTURA</b>          | <b>151 000</b>    |                        |
| <b>PIENSOS PARA MASCOTAS</b>      |                   |                        |
| Perros                            | 813 111           | 80,56                  |
| Gatos                             | 160 507           | 15,90                  |
| Otros                             | 35 649            | 3,53                   |
| <b>TOTAL MASCOTAS</b>             | <b>1 009 267</b>  |                        |

Fuente: MAPAMA (2017)

Por otro lado, tal como se indicó inicialmente (1.1 Tipos de piensos que se emplean en la producción animal), se pueden clasificar los piensos según sean complementario, medicamentoso (aquí se incluyen los piensos aditivados con antiparasitarios), no medicamentoso o ecológico. El mayor volumen de producción en España durante el año 2016 correspondió a piensos completos no medicamentosos, con más de 20 millones de Tm, siguiéndole muy de lejos el volumen de pienso complementario, con algo más de nueve millones de Tm. El volumen producido de pienso medicamentoso fue de más de 4.000 Tm repartidas entre pienso medicamentoso con antiparasitario (576 648 Tm) y pienso medicamentoso con antibacterianos (3 690 333 Tm) (Tabla 1.4.).

**Tabla 1.5. Producción en España de los diferentes tipos de piensos**

| TIPO DE PIENSO                           | PRODUCCIÓN 2016 (Tm) |
|--|----------------------|
| Pienso complementario                    | 9 049 606            |
| Pienso completo no medicamentoso         | 20 626 404           |
| Pienso medicamentoso                     | 4 266 981            |
| Pienso medicamentoso con antiparasitario | 576 648              |
| Pienso medicamentoso con antibacterianos | 3 690 333            |
| Pienso ecológico                         | 31 959               |

Fuente: MAPAMA (2016)

## **1.5. CONTROL DE TETRACICLINAS, SULFONAMIDAS, FENICOLES Y COCCIDIOSTÁTICOS EN LOS PIENSOS**

### **1.5.1. La importancia de la contaminación cruzada**

El uso extendido de antimicrobianos con fines veterinarios o en su día como promotores de crecimiento ha favorecido el desarrollo de bacterias con genes de resistencia a estas sustancias, convirtiéndose actualmente en un problema crucial de salud. Esto está causando una gran preocupación en el ámbito de la seguridad alimentaria mundial,



incluido el sector de los piensos. Es por ello por lo que el control de piensos medicamentosos, sobre todo los que contienen antimicrobianos, se está llevando a cabo de manera exhaustiva. Además, se ha demostrado la presencia de sustancias farmacológicamente activas en piensos a los que no están destinadas, por transferencia inevitable durante la fabricación de estos piensos (Stolker y col., 2013) ya que en la línea de producción pueden permanecer trazas de antimicrobianos. Estos residuos pueden ser introducidos en las tandas siguientes de piensos no destinatarios y contaminarlos. La contaminación cruzada puede tener lugar no sólo entre piensos de la misma especie sino entre piensos de diferentes especies. Además, la transferencia de los residuos no sólo ocurre durante la producción del pienso, sino también puede tener lugar durante el transporte, en el silo de almacenamiento, o en los circuitos de distribución.

El consumo de piensos con residuos de sustancias activas tales como antimicrobianos o antiparasitarios como consecuencia de una contaminación cruzada puede dar lugar a presencia de dichas sustancias en los alimentos de origen animal (huevos, músculo, grasa, hígado, riñón y leche). Es así como surgieron el Reglamento 470/2009, relativo a los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal y la Directiva 2009/8/CE, sobre los contenidos máximos de coccidiostáticos o histomonostatos presentes en piensos como resultado de una transferencia inevitable. La Directiva dio lugar a un mayor control de la presencia de residuos de coccidiostáticos en piensos tanto por parte de los fabricantes de piensos como de las administraciones competentes.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, existe legislación para controlar la contaminación cruzada que puede tener lugar durante la producción de piensos aditivados con coccidiostáticos. Además, recientemente se ha publicado un nuevo Reglamento que también hace referencia al control de contaminación cruzada que puede tener lugar durante la elaboración de piensos medicamentosos (Reglamento 2019/4). Mientras que para los coccidiostáticos se han establecido

límites máximos (LM) en el Reglamento 574/2011, en la actualidad, no existen LM de antimicrobianos en los piensos no desinfectados, de hecho su presencia está totalmente prohibida, sin embargo, el reciente Reglamento 2019/4 establece que antes del 2023 se deberían instaurar LM para determinados antimicrobianos, tal y como se ha comentado anteriormente (1.1.1.2 Pienso medicamentoso).

Dada la importancia que tiene prevenir y controlar la presencia de residuos de sustancias activas, se han implantado en las diferentes fábricas de piensos protocolos de toma de muestras para el control de la contaminación cruzada con el objetivo de trabajar con datos homogéneos, ya que dentro de una misma fábrica, el dato de contaminación cruzada puede variar mucho dependiendo del lugar y el momento donde se toma la muestra. El Reglamento 691/2013 establece los métodos de muestreo de muestras destinadas a control oficial y es el modelo que se emplea en muchas fábricas.

Existen estudios, tales como el llevado a cabo por la Asociación Gallega de Fabricantes de Alimentos Compuestos en colaboración con la Consellería do Medio Rural, durante los años 2015 y 2016, que ponen de manifiesto la contaminación cruzada y el impacto de las medidas de minimización (AGAFAC, 2017). En dicho estudio se eligieron como marcadores el cobalto, un aditivo del grupo de los coccidiostáticos y un antimicrobiano del grupo de las tetraciclinas; el coccidiostático y la tetraciclina elegidos variaban de unas instalaciones a otras, en función de las fabricaciones realizadas habitualmente, incluyéndose en el estudio oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, robenidina, salinomycin, lasalocid y monensina. Se estudió el efecto de la contaminación cruzada en 32 fábricas y 34 mezcladoras. Se estableció una metodología estandarizada para la toma de muestras, que consistió en tomar 10 muestras para el estudio de las mezcladoras y 30 muestras a la salida de la mezcladora y 30 muestras al final de línea para el estudio de la contaminación cruzada. El estudio concluyó que tenía lugar la transferencia inevitable de sustancias activas y que ésta es un factor intrínseco al proceso de fabricación. Sin embargo, se observó una gran variabilidad de los niveles de contaminación en las distintas fábricas

gallegas, dependiendo de las características estructurales (circuitos y maquinaria), de la molécula investigada y de las pautas de limpieza utilizadas (arrastre con materia prima o pienso de limpieza). Además, se comprobó que la contaminación cruzada se puede reducir aplicando unas medidas adecuadas de minimización (introducción de tandas de arrastre después de la fabricación del pienso medicamentoso, aplicación de la tabla de incompatibilidades a compuestos farmacológicos según especies, planificación de las fabricaciones de piensos medicados en determinados días y horas, elección de premezclas con menor tendencia a “adherencias”, etc.). No obstante, se concluyó que no es posible asegurar un 0% de contaminación cruzada (AGAFAC, 2017).

### **1.5.2. Métodos de detección y cuantificación**

En el caso de metodología de análisis de sustancias activas (antimicrobianos o coccidiostáticos) en piensos hay que tener en cuenta que se dan dos escenarios diferentes: el análisis de piensos medicados o aditivados y el de piensos no destinatarios o no aditivados. La diferencia entre ambos radica en la concentración de la sustancia activa. En el caso de piensos aditivados con coccidiostáticos y de piensos medicamentosos la concentración suele ser del orden de 25-200 mg/kg. Por el contrario, en el caso de contaminación cruzada, ya sea por presencia de coccidiostáticos o por antimicrobianos, las concentraciones suelen ser del orden de 0,1-10 mg/kg.

Independientemente de la concentración, los métodos de análisis de muestras de control oficial europeas deben cumplir los criterios establecidos por la Decisión 2002/657/CE. A pesar de que este documento sólo regula las muestras de control oficial, es la legislación que emplean como modelo la mayoría de los laboratorios y la que sirve de guía a las entidades nacionales de acreditación.

La Decisión 2002/657/CE establece todos los requisitos que deben cumplir los métodos de análisis para el control de determinadas

sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos para garantizar la calidad y comparabilidad de los resultados analíticos entre laboratorios con criterios comunes de interpretación de resultados.

En la determinación de sustancias activas a bajas concentraciones se pueden diferenciar dos tipos de métodos; métodos de cribado y métodos confirmatorios. Según Decisión 2002/657/CE los **métodos de cribado** son métodos utilizados para detectar la presencia de una sustancia, o tipo de sustancias, al nivel de interés. Estos métodos permiten tratar un elevado número de muestras y se utilizan para analizar grandes cantidades de muestras en busca de posibles resultados no conformes. Están diseñados específicamente para evitar resultados de falso conforme. Por otro lado, la Decisión define como **método de confirmación** al método que proporciona información total o complementaria que permite identificar y, en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés.

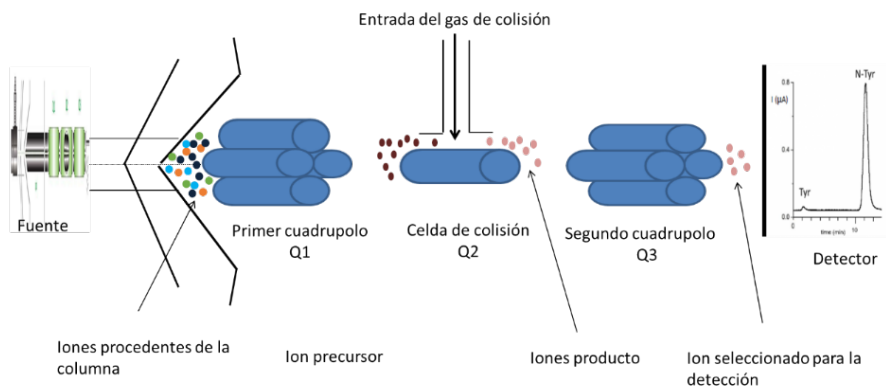
En cuanto a las técnicas de detección que aparecen en la bibliografía científica, la más utilizada es la cromatografía líquida con detector de masas (LC-MS). En la bibliografía científica se puede encontrar diversos métodos para detección y cuantificación de las sustancias activas objeto de estudio de este trabajo de investigación. Estas técnicas se basan fundamentalmente en cromatografía líquida de alta resolución HPLC (del inglés High Performance Liquid Chromatography) o UPLC® (del inglés Ultra Performance Liquid Chromatography), acoplados a espectrofotómetro de masas (MS) (Homazábal y col., 2002; Kot-Wasik y col., 2005; Mortier y col., 2005; Mortier y col., 2005; Mol y col., 2008; Vincent y col., 2008; Boscher y col., 2010; Cronly y col., 2010; Dai y col., 2010; Delahaut y col., 2010; De la Huebra y col., 2010; Kantiani y col., 2010; Vudathala y col., 2012; Patyra y col., 2015; Pietruk y col., 2015; Robert y col., 2015).

También, es común el análisis por HPLC empleando detector de ultravioleta (UV) (Caballero y col., 2002; Viñas y col., 2006; Wang y col., 2008; Jiménez y col., 2009; Granados-Chinchilla y col., 2012;

Hayes y col., 2013; Pietro y col., 2014; Yang y col., 2017), detectores de ultravioleta y visible (UV-VIS) denominados comúnmente detectores de DAD (del inglés Diode Array Detector) (Patyra y col., 2013) y detectores de fluorescencia (FL) (Naidong y col., 2003; AOAC 2008; Focht y col., 2008; Sánchez y col., 2008), o el detector de MS tipo orbitrap (Boix y col., 2014; Van der Heeft y col., 2009; Kaklamanos y col., 2013; Gómez-Pérez y col., 2015).

En concreto, de los métodos confirmatorios, la mayoría de los métodos de determinación de sustancias activas emplean técnicas basadas en HPLC-MS (Borràs y col., 2011) ya que permiten una identificación definitiva de los compuestos y una cuantificación a bajos niveles. Tanto las tetraciclinas, como las sulfonamidas, los fenicoles y los coccodiestaticos se suelen detectar empleando fuentes de ionización de presión atmosférica (API) con electrospray (ESI) ya sea en modo positivo o en modo negativo. En este tipo de fuentes el líquido procedente del HPLC se volatiliza y ioniza por el efecto de una diferencia de potencial en el capilar (Pramanik y col., 2002).

Una vez que la molécula ha sido ionizada en la fuente, entran al analizador y son separadas en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Según el tipo de analizador, podemos citar los de sector magnético, de doble enfoque, cuadrupolos, de tiempo de vuelo (TOF), de trampa de iones (Qtrap) y transformada de Fourier (FT). En general, tal y como se verá más adelante, la determinación de sustancias farmacológicas en matrices alimentarias y piensos se basan en espectrómetros de masas con dos o tres analizadores de cuadrupolos (MS/MS), éstos están acoplados por medio de una celda de colisión o de un analizador Qtrap. Los sistemas MS/MS son altamente específicos y selectivos cuando los dos cuadrupolos operan en modo estático. En este modo de detección, el primer cuadrupolo ( $Q_1$ ) actúa como un filtro de los iones precursores y el segundo cuadrupolo ( $Q_3$ ) filtra los iones productos que se han formado en la celda de colisión o trampa iónica ( $Q_2$ ) (Figura 1.14). Esta manera de trabajar de los MS/MS se denomina modo MRM (del inglés Multiple Reaction monitoring)



**Figura 1.14. Diagrama general de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo**

Además de elegir bien el sistema de detección, para la cuantificación de las sustancias farmacológicas en una matriz tan compleja y diversa como es el pienso por su variable contenido de materias primas (apartado 1.2.2), es necesario realizar una técnica de extracción adecuada. Esta suele constar de dos etapas: una extracción inicial de las sustancias del pienso con solventes orgánicos, seguido de una fase de limpieza del extracto obtenido. En cuanto a la fase de extracción inicial, para las sustancias investigadas se han empleado como solventes de extracción acetonitrilo sólo o acetonitrilo con un tampón, o un ácido, o con sulfato sódico anhidro, o con ácido acético (De la Huebra y col., 2010; Cronly y col., 2010; Patyra y col., 2013; Boix y col., 2014), también se han publicado métodos con acetonitrilo y agua (Mol y col., 2008; Björklund y col., 2011; Aguilera y col., 2013; Hayes y col., 2013; Gómez-Pérez y col., 2015), extracciones empleando Quechers (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (León y col., 2016). Sin embargo, hay otros métodos de extracción que en vez de emplear acetonitrilo emplean metanol únicamente o metanol combinado con ácido clorhídrico, cloruro de calcio, amonio o ácido acético (Mortier y col., 2005; Focht y col., 2008; Sánchez y col., 2008; AOAC 2008; Olejnik y col., 2013; Robert y col., 2015; Pietruk y col., 2015) y también metanol y agua (UNE-EN-ISO 14183:2005; Vincent y col., 2008; Dai y col., 2010; Kantiani y col., 2010; Vudathala y col., 2012).

También se pueden encontrar en la bibliografía científica extracciones con los dos solventes orgánicos, metanol y acetonitrilo (Van der Heeft y col., 2009; Pietro y col., 2014), con acetato de etilo (Shinoda y col., 2011; An y col., 2016; Yang y col., 2017). En ocasiones, se propone el uso del tampón etilén diamino tetra-acético (EDTA) de sodio, que puede ir combinado con metanol, o con metanol y acetonitrilo (Tong y col., 2009; Boscher y col., 2010; Patyra y col., 2015).

Dada la complejidad de los extractos obtenidos con los piensos hay autores que los purifican con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). Como es el caso Hayes y col. (2005) y Shinoda y col. (2011) que emplearon ENVI-Carb para la determinación de anfenicoles en piensos de pescado y otros animales. Sin embargo para el cloranfenicol Viñas y col. (2006) emplearon un cartucho con una amina (DSC-18Lt). Los cartuchos Oasis® HLB de Waters se han empleado para determinar antimicróticos tales como las tetraciclinas, sulfonamidas y macrólidos (Tong y col., 2009; Kantiani y col., 2010; Granados-Chinchilla y col., 2012). Para la purificación de extractos con coccidiostáticos Vicent y col. (2008) emplearon cartuchos de sílica (IST Isolute®) para monensina, salinomycin, narasin, lasalocid, semduramicina y maduramicina. Las columnas de tipo Florisil® han sido descritas en artículos publicados sobre métodos multiresiduos de más de 50 compuestos. Aunque son numerosas las referencias que prescinden de este paso, de purificación del extracto, optando por una dilución (Hormazábal y col., 2002; Focht y col., 2008; Sánchez y col., 2008; Van der Heeft y col., 2009; Jiménez y col., 2009; De la Huebra y col., 2010; Granados-Chinchilla y col., 2012; Boix y col., 2014), en general se recurre a filtrar el extracto con filtro de tamaño de poro de 0.45 µm o menor (Mortier y col., 2005; AOAC 2008; UNE-EN-ISO-14183; UNE-EN-15782; Dai y col., 2010; De la Huebra y col., 2010; Vudathala y col., 2012; Kaklamanos y col., 2013; Pietro y col., 2014; León y col., 2016; Wang y col., 2016).



### 1.5.2.1. Validación de los métodos analíticos

Como se ha dicho anteriormente, la legislación europea que regula las normas y criterios comunes para los métodos de análisis utilizados para la detección de residuos de fármacos veterinarios es la Decisión 2002/657/CE. Según dicha decisión se podrán utilizar como métodos confirmatorios las técnicas de análisis basadas en LC, HPLC, UPLC y la cromatografía de gases (GC). Estas técnicas de análisis cromatográfico pueden ir acopladas a sistemas de detección tales como MS, espectrofotometría de infrarrojo (IR), FL o DAD.

Teniendo en cuenta la afirmación de Borrás y col. (2011) que indica que la mayoría de los métodos confirmatorios se basan en técnicas de HPLC-MS/MS, para el análisis en piensos de las sustancias investigadas a lo largo de los próximos capítulos de este trabajo (tetraciclinas, fenicoles, sulfonamidas-trimetoprim y coccidiostáticos), se han encontrado métodos cuya validación se ha basado en los criterios de la Decisión 2002/657/CE. Así, Mortier y col. (2005) publicaron un método para determinar cinco coccidiostáticos (halofuginona, robenidina, diclazuril, nicarbazina y dimetridazol). Posteriormente, Delahaut y col. (2010), publicaron un método para determinar 11 coccidiostáticos en piensos destinados a la alimentación de pollos, cerdos y vacas lecheras. Cronly y col. (2010) desarrollaron un protocolo para determinar en piensos de cerdo y de pollo catorce sustancias prohibidas, entre las que se encuentran dos sulfonamidas. También Boscher y col. (2010), publicaron un método para 33 sustancias activas, 13 de ellas antimicrobianos, analizando piensos de lechones, bovino y corderos. En este caso, después de una extracción inicial con metanol, acetonitrilo y tampón McIlvaine los extractos se purificaron con PSA y d-SPE. Posteriormente, en 2015, Pietruk y colaboradores desarrollaron un método para determinar 11 coccidiostáticos autorizados y 4 prohibidos en piensos de ganado, pavos, gallinas y pollos. Shinoda y col. (2011), desarrollaron un método para la cuantificación de cloranfenicol y florfenicol en piensos para peces y para cerdos, purificando los extractos con cartuchos de ENVI-Carb. Patyra y col. (2018), validaron un método para la detección de 11 antibacterianos en piensos, entre ellos 2 sulfonamidas.



No obstante, a día de hoy no se encontró un método HPLC-MS/MS para la detección y cuantificación de residuos de coccidiostáticos en piensos en el que se haya calculado cada CC $\alpha$  y CC $\beta$  para los distintos LM según las especies animales a las que estos piensos vayan destinados. Además, se ha constatado la escasez o la carencia de métodos validados siguiendo estos mismos criterios de la Decisión para la determinación simultánea de residuos del grupo de sulfonamidas, para el grupo de tetraciclinas y para el grupo de fenicoles, también mediante HPLC-MS/MS. Si además, se plantea la posibilidad de validar unos métodos cuya extracción pueda simplificarse prescindiendo de purificación mediante cartucho, el interés de los métodos presentados en este estudio queda sobradamente justificado.

A continuación se pasa a indicar algunos de los requisitos fundamentales que establece la Decisión para métodos de HPLC-MS/MS. Se requieren cuatro puntos de identificación que se consigue con la monitorización de dos transiciones MRM entre un mismo ion precursor y sus dos iones productos y por el tiempo de retención. Es frecuente emplear esta forma de detección para el control de residuos en diversas matrices de origen animal (Chiaochan y col., 2010; Lopes y col., 2011; Hurtaud-Pessel y col., 2011).

Según la Decisión 2002/657/CE, en lo que se refiere a requisitos de evaluación de la veracidad y precisión se especifica que en caso de no disponer de material de referencia certificado no se determinará la veracidad, sino la recuperación, definida la recuperación como “el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico”. Este factor se determina durante la validación si no se dispone de material de referencia certificado. La recuperación se calculará empleando muestras de pienso blanco enriquecidas con las sustancias objeto de estudio. Para ello son necesarias muestras de material blanco agrupadas en tres grupos de seis muestras. Estos grupos consistirán en muestras fortificadas a 0.5, 1 y 1.5 x límite máximo (LM) o límite de validación (LV). Además, se necesitarán tres muestras de material blanco adicionales, a la primera no se le añadirán sustancias activas, a las segunda se le añadirá 2 x

LM o LV y a las tercera se le adicionará 5 x LM o LV. En cualquier caso, la recuperación deberá estar dentro de los límites que establece la legislación (Tabla 1.6).

**Tabla 1.6. Rangos de recuperación aceptados por la Decisión 2002/657/CE para los métodos confirmatorios**

| INTENSIDAD RELATIVA | TOLERANCIAS MÁXIMAS PERMITIDAS |
|---------------------|--------------------------------|
| >50%                | +20%                           |
| >20% - <50%         | +25%                           |
| >10% - <20%         | +30%                           |
| <10%                | +50%                           |

La precisión queda definida como el grado de concordancia entre varios análisis realizados a un material enriquecido, con resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad (en el mismo día) y reproducibilidad (en diferentes días). La precisión se expresa como la desviación estándar relativa (RSD) de las recuperaciones obtenidas para cada concentración en condiciones de repetibilidad ( $RSD_r$ ) y de reproducibilidad ( $RSD_R$ ).

Los valores de  $RSD_R$  no podrán superar los obtenidos mediante la ecuación de Horwitz. La Tabla 1.7 muestra ejemplos de  $RSD_R$  de los métodos cuantitativos en un intervalo de fracciones de masa de analito.

$$\text{Ecuación de Horwitz: } RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Donde C es la fracción de masa expresada como potencia (exponente) de 10 (por ejemplo, 1 mg/g=10<sup>-3</sup>).

**Tabla 1.7. Valores máximos permitidos de  $RSD_R$  para los métodos cuantitativos en un intervalo de fracciones de masa del analito**

| Fracción de masa      | $RSD_R$ |
|-----------------------|---------|
| 1 $\mu\text{g/kg}$    | (*)     |
| 10 $\mu\text{g/kg}$   | (*)     |
| 100 $\mu\text{g/kg}$  | 23      |
| 1000 $\mu\text{g/kg}$ | 16      |

\*Los valores de  $RSD_R$  deben ser lo más bajos posible.

En análisis realizados en condiciones de repetibilidad los  $RSD_r$  suelen arrojar cifras situadas entre la mitad y los dos tercios de los  $RSD_R$  y no podrán ser superiores a los  $RSD_R$ .

En la Decisión destaca la incorporación del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $CC\beta$ ). El  $CC\alpha$  es el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error inferior al 5% que una muestra es no conforme. El  $CC\beta$  es el contenido mínimo de sustancia que puede ser detectado, identificado y/o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error inferior al 5%. La Decisión contempla que  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  se pueden calcular mediante una curva de calibración o mediante el análisis de 20 materiales blancos enriquecidos con el/los analitos, aunque lo más común es calcular  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  con curvas de calibración. Hay que resaltar que se emplean diferentes fórmulas si son sustancias prohibidas o permitidas. La Tabla 1.8 muestra las formulas necesarias para el cálculo de  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  en cada caso.

**Tabla 1.8. Cálculo de  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  para sustancias con LMR y sustancias sin LMR**

| Sustancias con LMR                    | Sustancias sin LMR                    |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| $CC\alpha = LM + 1,64 RSD_R Y_a$      | $CC\alpha = Y_a + 2,33 RSD_R Y_a$     |
| $CC\beta = CC\alpha + 1,64 RSD_R Y_a$ | $CC\beta = CC\alpha + 1,64 RSD_R Y_a$ |

$Y_a$  es la concentración que indica la ordenada en el origen de la recta obtenida al representar la señal generada frente a la concentración teórica añadida.  $RSD_R Y_a$  es la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de la ordenada en el origen.

## 1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEMPS, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2018). Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos. Informe anual 2016-2017. Accedido en febrero 2018 a través de

[http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe\\_anual\\_pran\\_2016-2017.pdf?file=1&type=node&id=441&force=0](http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_anual_pran_2016-2017.pdf?file=1&type=node&id=441&force=0)

AGAFAC, Asociación Gallega de Fabricantes de Alimentos Compuestos (2017). Resultados del estudio de contaminación cruzada y homogeneidad en 2015-2016 en fábricas GALIS. *XIX Jornada técnica de la Fundación Instituto Tecnológico del Pienso*. Santiago de Compostela, España.

Aguilera-Luiz, M. M., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2013). Wide-scope analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(20), 6543-6553.

Alltech Global Feed Survey (2017). Global Feed Production surpasses 1 billion metric tons for first time, with fewer feed mills. Accedido en junio 2018 a través de <https://go.alltech.com/alltech-feed-survey-2017>.

An, L., Wang, Y., Pan, Y., Tao, Y., Chen, D., Liu, Z., Yuan, Z. (2016). Development and validation of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of florfenicol and thiamphenicol in edible animal tissue and feed. *Food analytical methods*, 9(9), 2434-2443.

Animalhealth Europe (2018). The European animal medicines industry in figures. Accedido en noviembre 2018 a través de <https://www.animalhealthurope.eu/resources/34:facts-figures.html>.

AOAC (1975). AOAC Official Methods 975.61. Lasalocid in feeds. Spectrofluorometric method. *Official Methods of Analysis of AOAC international*, 58 507

AOAC (2008). AOAC Official Methods 2008.9. Oxytetracycline/oxytetracycline hydrochloride in animal feed, fish feed and animal remedies. *Official Methods of Analysis of AOAC international*, 18, 82-87.

AOAC (2008). AOAC Official Methods 2008.08. Decoquinat in Animal Feeds. Liquid Chromatography. *Official Methods of Analysis of AOAC international*, 91, 685.

Ausina Ruiz, V., Moreno Guillén, S. (2006). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Madrid. Editorial Médica Panamericana.

Bienenmann-Ploum, M. E., Huet, A. C., Campbell, K., Fodey, T. L., Vincent, U., Haasnoot, W., Nielen, M. W. (2012). Development of a five-plex flow cytometric immunoassay for the simultaneous detection of six coccidiostats in feed and eggs. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(5), 1361-1373.

Björklund, E., Maya, F., Bak, S. A., Hansen, M., Estela, J. M., Cerdá, V. (2011). Possibilities and limitations of the sequential injection chromatography technique for the determination of anticoccidial agents in water, pharmaceutical formulations and feed. *Microchemical Journal*, 98(2), 190-199.

Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J. V., León, N., Yusá, V., Hernández, F. (2014). Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry:

Potential application to quantitative analysis. *Food chemistry*, 160, 313-320.

Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A. M., Brufau, J., Medina, M. Bosch, J. (2011). Analysis of antimicrobial agents in animal feed. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), 1042-1064.

Boscher, A., Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., Bohn, T. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6394-6404.

Caballero, R. D., Torres-Lapasió, J. R., García-Alvarez-Coque, M. C., Ramis-Ramos, G. (2002). Rapid liquid chromatographic determination of tetracyclines in animal feeds using a surfactant solution as mobile phase. *Analytical letters*, 35(4), 687-705.

Cherlet, M., Schelkens, M., Croubels, S., De Backer, P. (2003). Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492(1-2), 199-213.

ChiaoChan, C., Koesukwiwat, U., Yudthavorasit, S., Leepipatpiboon, N. (2010). Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. *Analytica chimica acta*, 682(1-2), 117-129.

Consejo de la Unión Europea. Bruselas, 2008. Informe de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo sobre la utilización de los coccidiostáticos y los histomonóstatos como aditivos para piensos. 5 de mayo de 2008. Accedido en febrero de 2018 a través de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52008DC0233&from=ES..>

Cronly, M., Behan, P., Foley, B., Malone, E., Earley, S., Gallagher, M., Regan, L. (2010). Development and validation of a rapid multi-class method for the confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(4), 929-938.

Dai, S. Y., Herrman, T. J. (2010). Evaluation of two liquid chromatography/tandem mass spectrometry platforms for quantification of monensin in animal feed and milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 24(10), 1431-1438.

De la Huebra, M. J. G., Vincent, U., Von Holst, C. (2010). Determination of semduramicin in poultry feed at authorized level by liquid chromatography single quadrupole mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(4), 860-868.

Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002 Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las comunidades europeas*, L221; 17 de agosto de 2002; 8-36.

Delahaut, P., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., Gillard, N. (2010). Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC–MS/MS. *Food Additives and Contaminants*, 27(6), 801-809.

Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L311; 28 de noviembre de 2001;1-66.

Directiva 2009/8/CE de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que modifica el Anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento

Europeo y del Consejo, por lo que respecta a los contenidos máximos de coccidiostáticos o histomonóstatos presentes, como resultado de una transferencia inevitable, en los piensos a los que no están destinadas dichas sustancias. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L40; 11 de febrero de 2009;19-25.

Dorne, J. L. C. M., Fernández-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., Sanders, P., Wester, P. Fink-Gremmels, J. (2013). Risk assessment of coccidiostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270(3), 196-208.

European Medicines Agency (2017). European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2017. 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015'. (EMA/184855/2017). Accedido en febrero 2018 a través de [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf).

FAO, (2003). *Desarrollo de la acuicultura -1. Procedimientos idóneos en la fabricación de alimentos para la acuicultura*. Accedido en febrero de 2018 a través de <http://www.fao.org/3/y1453s05.htm>.

Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) (2010). *Ingredientes para piensos (Tablas FEDNA 2010)*. Accedido en febrero de 2018 a través de <http://www.fundacionfedna.org/ingredientes-para-piensos>

Fernández-González, R., García-Falcón, M. S., Simal-Gándara, J. (2002). Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 455(1), 143-148.

Focht, C. (2008). Determination of lasalocid sodium in animal feeds and premixes by reversed-phase liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 91(3), 479-488.



Food Chain Evaluation Consortium (2010). Evaluation of the EU legislative framework in the field of medicated feed. Final Report. Accedido en diciembre 2018 a través de [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-medic-medicated\\_feed\\_report\\_20100224.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-medic-medicated_feed_report_20100224.pdf)

Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, R., Martínez Vidal, J. L., Garrido Frenich, A. (2015). Analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry: comparison between time-of-flight and Orbitrap. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(10), 1637-1646.

Granados-Chinchilla, F., Sánchez, J., Garcia, F., Rodríguez, C. (2012). A novel green chemistry method for nonaqueous extraction and high-performance liquid chromatography detection of first-, second-, and third-generation tetracyclines, 4-epitetracycline, and tylosin in animal feeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(29), 7121-7128.

Hayes, J. M. (2005). Determination of florfenicol in fish feed by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 88(6), 1777-1783.

Hayes, J. (2013). Determination of florfenicol in fish feeds at high inclusion rates by HPLC-UV. *Journal of AOAC International*, 96(1), 7-11.

Hormazabal, V., Yndestad, M., Ostensvik, O. (2002). Determination of amprolium, ethopabate, lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in feed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 25(17), 2655-2663.

Hurtaud-Pessel, D., Jagadeshwar-Reddy, T., Verdon, E. (2011). Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap

instrument. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(10), 1340-1351.

Jiménez, V., Companyó, R., Guiteras, J. (2009). Preparation of quality control materials for the determination of sulfonamides in animal feed. *Food Additives and Contaminants*, 26(7), 969-977.

Kaklamanos, G., Vincent, U., von Holst, C. (2013). Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1293, 60-74.

Kantiani, L., Farré, M., Freixiedas, J. M. G., Barceló, D. (2010). Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry method for  $\beta$ -lactams and sulfonamides in animal feed. *Journal of Chromatography A*, 1217(26), 4247-4254.

Koesukwiwat, U., Jayanta, S., Leepipatpiboon, N. (2007). Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *Journal of chromatography A*, 1140(1-2), 147-156.

Kot-Wasik, A., Wasik, A. (2005). Determination of robenidine in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction. *Analytica chimica acta*, 543(1-2), 46-51.

León, N., Pastor, A., Yusà, V. (2016). Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 149, 43-52.

Lopes, R. P., Augusti, D. V., de Souza, L. F., Santos, F. A., Lima, J. A., Vargas, E. A., Augusti, R. (2011). Development and validation

(according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. *Analytical Methods*, 3(3), 606-613.

MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Medio Ambiente, Encuestas Ganaderas (2016). Accedido en marzo 2018 a través de <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-ganaderas/>

Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (2018). Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos. Informe anual 2016-2017,. Accedido en agosto 2018 a través de <http://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-anual-2016-2017-plan-nacional-frente-resistencia-antibioticos>

Martínez-Villalba, A., Moyano, E., Galceran, M. T. (2009). Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. *Rapid communications in mass spectrometry*, 23(9), 1255-1263.

Mevius, D. J., Sprenger, M. J. W., Wegener, H. C. (1999). EU conference 'the microbial threat'. *International journal of antimicrobial agents*, 11(2), 101-105.

Mol, H. G., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., de Rijk, T. C., Stolker, A. A., Mulder, P. P. (2008). Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry*, 80(24), 9450-9459.

Mortier, L., Daeseleire, E., Van Peteghem, C. (2005). Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *Journal of Chromatography B*, 820(2), 261-270.

Naidong, W., Hua, S., Roets, E., Hoogmartens, J. (2003). Assay and purity control of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline in animal feeds and premixes by TLC densitometry with fluorescence detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 33(1), 85-93.

Olejniak, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. (2013). The determination of six ionophore coccidiostats in feed by liquid chromatography with postcolumn derivatisation and spectrophotometric/fluorescence detection. *The Scientific World Journal*, 1-8.

Patyra, E., Kowalczyk, E., Kwiatek, K. (2013). Development and validation method for the determination of selected tetracyclines in animal medicated feedingstuffs with the use of micellar liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(21), 6799-6806.

Patyra, E., Kwiatek, K. (2016). Analytical procedure for the determination of tetracyclines in medicated feedingstuffs by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Veterinary Research*, 60(1), 35-41.

Patyra, E., Nebot, C., Gavilán, R. E., Cepeda, A., Kwiatek, K. (2018). Development and validation of multi-residue and multi-class method for antibacterial substances analysis in non-target feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(3), 467-478.

Pérez-Trallero, E., Trallero, E. P., Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 21(9), 520-529.

Pietro, W. J., Woźniak, A., Pasik, K., Cybulski, W., Krasucka, D. (2014). Amphenicols stability in medicated feed–development and validation of liquid chromatography method. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58(4), 621-629.

Pietruk, K., Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. (2015). Determination of fifteen coccidiostats in feed at carry-over levels using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 112, 50-59.

Pramanik, B. N., Ganguly, A. K., Gross, M. L. (Eds.). (2002). *Applied electrospray mass spectrometry: practical*, Vol. 32. CRC Press, Florida, EEUU.

Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y fármaco-vigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente. *Boletín Oficial del Estado* n° 193; 11 de agosto de 2008; 34044-34084.

Real Decreto 1409/2009, de 4 de septiembre, por el que se regula la elaboración, comercialización, uso y control de los piensos medicamentosos. *Boletín Oficial del Estado* n° 226; 28 de septiembre; 77891-77909.

Registro de la Unión Europea de Aditivos para Piensos conforme al Reglamento (CE) n° 1831/2003. Anexo I: Lista de aditivos. Publicado el 17.12.2018. Accedido en diciembre 2018 a través de [https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives/eu-register\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives/eu-register_en).

Reglamento 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L31; 1 de febrero de 2002; 1-24.

Reglamento 1831/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268; 18 de octubre de 2003; 29-43.

Reglamento 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L136; 30 de abril de 2004; 1-33.

Reglamento 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) 2092/91. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L189; 20 de julio de 2007; 1-23.

Reglamento 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos. *Diario Oficial de la Unión Europea*; L54; 26 de febrero de 2009; 1-130.

Reglamento 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L152; 16 de junio de 2009; 11-22.

Reglamento 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de julio de 2009 sobre la comercialización y la utilización de los piensos, por el que se modifica el Reglamento (CE) 1831/2003 y se derogan las Directivas 79/373/CEE del Consejo, 80/511/CEE de la Comisión, 82/471/CEE del Consejo, 83/228/CEE del Consejo, 93/74/CEE del Consejo, 93/113/CE del Consejo y 96/25/CE del Consejo y la Decisión 2004/217/CE de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L229; 1 de septiembre de 2009; 1-28.

Reglamento 37/2010, sobre sustancias farmacológicamente activas y su clasificación teniendo en cuenta los límites máximos residuales en alimentos de origen animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L15, 20 de enero de 2010; 1-72.

Reglamento 574/2011, de 16 de junio de 2011, por el que se modifica el Anexo I de la Directiva 2002/32/CE el Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melamina y *Ambrosia spp.*, y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonóstatos, y por la que se consolidan sus anexos I y II. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L159; 17 de junio de 2011; 7-24.

Reglamento 691/2013 de la Comisión, de 19 de julio de 2013, que modifica el Reglamento (CE) n° 152/2009 en cuanto a los métodos de muestreo y análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L197; 20 de julio de 2013; 1-12.

Reglamento 2017/1017 de la Comisión, de 15 de junio de 2017, por el que se modifica el Reglamento (UE) 68/2013 relativo al catálogo de materias primas para piensos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L159; 21 de junio de 2017; 48-119.

Reglamento 2019/4 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, relativo a la fabricación, comercialización y uso de piensos medicamentosos, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L4; 7 de enero de 2019; 1-23.

Reglamento 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L4; 7 de enero de 2019; 43-167.

Robert, C., Gillard, N., Brasseur, P. Y., Ralet, N., Dubois, M., Delahaut, P. (2015). Rapid multiresidue and multi-class screening for

antibiotics and benzimidazoles in feed by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control*, 50, 509-515.

Sánchez, A. A., Campbell, H. M. (2008). Determination of decoquinatone in animal feeds by liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 91(4), 685-693.

Shinoda, N., Kojima, F., Sugiura, K. (2011). Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol and Florfenicol in Animal Feed by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of residuals science and technology*, 8(3), 125-129.

Stolker, A. A. M., Manti, V., Zuidema, T., van Egmond, H., Deckers, E. R., Herbes, R., Hooglugt, J., Olde Heuvel, E., de Jong, J. (2013). Carry-over of veterinary drugs from medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants. *Food Additives & Contaminants*, 30(6), 1100-1107.

Sunderland, J., Lovering, A. M., Tobin, C. M., MacGowan, A. P., Roe, J. M., Delsol, A. A. (2003). Determination by HPLC of chlortetracycline in pig faeces. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 135-137.

Tong, J., Rao, Q., Zhu, K., Jiang, Z., Ding, S. (2009). Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. *Journal of separation science*, 32(23-24), 4254-4260.

UNE- EN ISO 14183.(2009) Alimentos para animales. Determinación de los contenidos de monensina, narasina y salinomicina. Método por cromatografía líquida utilizando transformación química postcolumna (ISO 14183:2005)



UNE-EN 15782 (2010). Alimentos para animales. Determinación de nicarbazina. Método por cromatografía líquida de alta resolución. (UNE-EN 15782:2019).

Vandenberge, V. (2012). Transfer of cross-contamination levels of coccidiostats, antibiotics and anthelmintics from feed to poultry matrices (Doctoral dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University).

Van der Heeft, E., Bolck, Y. J. C., Beumer, B., Nijrolder, A. W. J. M., Stolker, A. A. M., Nielen, M. W. F. (2009). Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(3), 451-463.

Vincent, U., Chedin, M., Yasar, S., von Holst, C. (2008). Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Part I. Application to targeted feed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4-5), 750-757.

Vincent, U., Ezerskis, Z., Chedin, M., von Holst, C. (2011). Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 54(3), 526-534.

Viñas, P., Balsalobre, N., Hernández-Córdoba, M. (2006). Determination of chloramphenicol residues in animal feeds by liquid chromatography with photo-diode array detection. *Analytica chimica acta*, 558(1-2), 11-15.

Vudathala, D., Murphy, L. (2012). Rapid method for the simultaneous determination of six ionophores in feed by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 95(4), 1016-1022.

Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y., Lu, X. (2008). Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, 619(1), 54-58.

Yang, J., Sun, G., Qian, M., Huang, L., Ke, X., Yang, B. (2017). Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of florfenicol in animal feedstuffs. *Journal of Chromatography B*, 1068, 9-14.



## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

La contaminación cruzada de sustancias con actividad farmacológica puede tener lugar durante la fabricación de piensos medicados o aditivados. Teniendo en cuenta la frecuencia del uso de antimicrobianos y antiparasitarios en el pienso de animales de abasto, la legislación vigente, así como la demanda del sector, el **objetivo general** de este trabajo se centra en desarrollar nuevos métodos de análisis de sustancias farmacológicas en piensos (coccidiostáticos, tetraciclinas, sulfonamidas, fenicoles) basados en HPLC-MS/MS para que puedan ser empleados para estimar contaminación cruzada en piensos.

. Para alcanzar este objetivo general se establecen los siguientes **objetivos específicos**:

**1.-** Desarrollo de un método para el análisis simultáneo de coccidiostáticos y sulfonamidas en piensos no aditivados y no destinatarios que permita su detección a niveles de traza (entre 40 y 100  $\mu\text{g/kg}$ ), útil para el control de la contaminación cruzada en piensos

**2.-** Desarrollo de un método para la cuantificación de tetraciclinas en piensos no destinatarios muy contaminados y en piensos medicados.

**3.-** Desarrollo de un método de identificación y cuantificación de residuos de tetraciclinas en piensos no destinatarios a niveles de traza (400  $\mu\text{g/kg}$ ).

**4.-** Desarrollo de un método analítico de determinación de fenicoles en piensos no destinatarios a niveles residuales (entre 40 y 100  $\mu\text{g/kg}$ ).

**5.-** Evaluar la existencia de contaminación cruzada en los piensos puestos a disposición de los animales de abasto, mediante el uso de los métodos de análisis desarrollados.



# **CAPÍTULO 3**

## **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE COCCIDIOSTÁTICOS Y SULFONAMIDAS EN PIENSOS**

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

El séptimo informe ESVAC destaca que la mayoría de los antimicrobianos vendidos pertenecían al grupo de tetraciclinas (33%), penicilinas (25%) y sulfonamidas (12%). En concreto, la mayor cantidad de sulfonamidas fue vendida en España (282,3 mg/PCU). Tal y como se mencionó en la introducción el uso frecuente de piensos medicados con sulfonamidas puede dar lugar a problemas de transferencia, tal como se ha comprobado en el caso de los coccidiostáticos (Galarini y col., 2009). Como consecuencia de los problemas causados por la inevitable transferencia de coccidiostáticos durante la fabricación de los piensos se publicó la Directiva 2009/8/CE y posteriormente el Reglamento 574/2011 que establece los LM permitidos de coccidiostáticos en piensos para las diferentes especies de animal, incluidos en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Aditivos autorizados para piensos en piensos a los que no están destinados como resultado de una transferencia inevitable**

| <b>COCCIDIOSTÁTICO</b> | <b>Productos destinados a la alimentación animal</b>  | <b>Contenido máximo (mg/kg) en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad de 12%</b> |
|------------------------|---|--|
| Decoquinato            | Materias primas para piensos  | 0,4  |
|                        | Piensos compuestos para   | 0,4  |
|                        | -Aves ponedoras y pollitas para puesta (>16 semanas)  | 0,4  |
|                        | -Pollos de engorde durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar decoquinato (piensos de retirada)                | 1,2  |
|                        | -Otras especies animales  | (*)  |
| Diclazuril             | Premezclas para uso en piensos en los que no está permitido el uso de diclazuril  | 0,01   |
|                        | Materias primas para piensos  | 0,01   |
|                        | Piensos compuestos para   | 0,01   |
|                        | -Aves ponedoras, pollitas para puesta (>16 semanas) y pavos de engorde (>12 semanas)  | 0,01   |
|                        | -Conejos de engorde y reproducción durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar diclazuril (piensos de retirada) | 0,01   |
|                        | -Otras especies animales distintas de pollitas para puesta (<16 semanas), pollos de engorde, pintadas y pavos de engorde (<12 semanas)      | (*)  |
|                        | Premezclas para uso en piensos en los que no está permitido el uso de diclazuril  | (*)  |

Tabla 3.1. Continuación

| COCCIDIOSTÁTICO             | Productos destinados a la alimentación animal   | Contenido máximo (mg/kg) en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad de 12% |
|-----------------------------|---|---|
| Bromhidrato de halofuginona | Materias primas para piensos  | 0,03  |
|                             | Piensos compuestos para   |   |
|                             | -Aves ponedoras, pollitas para puesta y pavos (>12 semanas)   | 0,03  |
|                             | -Pollos de engorde y pavos (<12 semanas) durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar bromhidrato de halofuginona (piensos de retirada)                            | 0,03  |
|                             | -Otras especies animales  | 0,09  |
|                             | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de bromhidrato de halofuginona  | (*)   |
| Lasalocid de sodio          | Materias primas para piensos  | 1,25  |
|                             | Piensos compuestos para   |   |
|                             | -Perros, terneros, conejos, équidos, animales lecheros, aves ponedoras, pavos (>16 semanas) y pollitas para puesta (>16 semanas)  | 1,25  |
|                             | -Pollos de engorde, pollitas para puesta (<16 semanas) y pavos (<16 semanas) durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar lasalocid de sodio (piensos de retirada) | 1,25  |
|                             | -Otras especies animales  | 3,75  |
|                             | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de lasalocid de sodio   | (*)   |

Tabla 3.1. Continuación

| COCCIDIOSTÁTICO             | Productos destinados a la alimentación animal   | Contenido máximo (mg/kg) en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad de 12% |
|-----------------------------|---|---|
| Maduramicina de amonio alfa | Materias primas para piensos  | 0,05  |
|                             | Piensos compuestos para<br>-Equidos, conejos, pavos (>16 semanas), aves ponedoras y pollitas para puesta (>16 semanas)  | 0,05  |
|                             | -Pollos de engorde y pavos (<16 semanas) durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar maduramicina de amonio alfa (piensos de retirada)                            | 0,05  |
|                             | -Otras especies animales  | 0,15  |
|                             | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de maduramicina de amonio alfa  | (*)   |
| Monensina sódica            | Materias primas para piensos  | 1,25  |
|                             | Piensos compuestos para<br>-Equidos, perros, pequeños rumiantes (ovinos y caprinos), patos, bovinos, vacas lecheras, aves ponedoras, pollitas para puesta (>16 semanas) y pavos (>16 semanas) | 1,25  |
|                             | -Pollos de engorde, pollitas para puesta (<16 semanas) y pavos (<16 semanas) durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar monensina sódica (piensos de retirada)   | 1,25  |
|                             | -Otras especies animales  | 3,75  |
|                             | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de monensina sódica   | (*)   |



Tabla 3.1. Continuación

| COCCIDIOSTÁTICO           | Productos destinados a la alimentación animal   | Contenido máximo (mg/kg) en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad de 12% |
|---------------------------|---|---|
| Clorhidrato de robenidina | Materias primas para piensos  | 0,7   |
|                           | Piensos compuestos para   |   |
|                           | -Aves ponedoras y pollitas para puesta (>16 semanas)  | 0,7   |
|                           | -Pollos de engorde, conejos de engorde y reproducción y pavos durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar clorhidrato de robenidina (piensos de retirada)           | 0,7   |
|                           | -Otras especies animales  | 2,1   |
|                           | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de clorhidrato de robenidina  | (*)   |
| Salinomicina de sodio     | Materias primas para piensos  | 0,7   |
|                           | Piensos compuestos para   |   |
|                           | -Equidos, pavos, aves ponedoras y pollitas para puesta (>12 semanas)  | 0,7   |
|                           | -Pollos de engorde, pollitas para puesta (<12 semanas) y conejos de engorde durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar salinomicina de sodio (piensos de retirada) | 0,7   |
|                           | -Otras especies animales  | 2,1   |
|                           | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de salinomicina de sodio  | (*)   |
| Semduramicina sódica      | Materias primas para piensos  | 0,25  |
|                           | -Aves ponedoras y pollitas para puesta (>16 semanas)  | 0,25  |
|                           | -Pollos de engorde durante el período anterior al sacrificio en el que está prohibido usar semduramicina sódica (piensos de retirada)   | 0,25  |
|                           | -Otras especies animales  | 0,75  |
|                           | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de semduramicina sódica   | (*)   |

Tabla 3.1. Continuación

| COCCIDIOSTÁTICO | Productos destinados a la alimentación animal  | Contenido máximo (mg/kg)<br>en piensos calculado sobre la<br>base de un contenido de<br>humedad de 12% |
|-----------------|--|--|
| Narasina        | Materias primas para piensos   | 0,7  |
|                 | Piensos compuestos para<br>-Pavos, conejos équidos, aves ponedoras y pollitas para puesta (>16<br>semanas)     | 0,7  |
|                 | -Otras especies animales   | 2,1  |
|                 | Premezclas para uso en piensos en los que no está autorizado el uso de<br>lasalocid de sodio                   | (*)  |
| Nicarbacina     | Materias primas para piensos   | 1,25   |
|                 | Piensos compuestos para<br>-Equidos, aves ponedoras y pollitas para puesta (>16 semanas)                       | 1,25   |
|                 | -Otras especies animales   | 3,75   |
|                 | Premezclas para piensos en los que no está autorizado el uso de<br>nicarbacina (sola o combinada con narasina) | (*)  |

(\*) El contenido máximo de la sustancia en la premezcla corresponde a una concentración que no dé lugar a un contenido de la sustancia superior al 50% del contenido máximo establecido para el pienso cuando se siguen las instrucciones de uso de la premezcla.

Para garantizar la seguridad alimentaria, y en base al Reglamento 2019/4, son necesarios métodos de control específicos para determinar la presencia de residuos de determinados antimicrobianos (1.1.2 Pienso medicamentoso) en piensos no destinatarios. En la bibliografía científica existen métodos para el análisis de residuos de coccidiostáticos en matrices alimentarias, tales como hígado, músculo, leche y huevo (Capurro y col., 2005; Szprengier-Juszkiewicz y col., 2009; Galarini y col., 2010). Del mismo modo se pueden encontrar numerosos métodos para sulfonamidas, el artículo publicado por Dimitrienko y col. (2014) contiene una completa revisión de ellos. Para el caso particular de los análisis de piensos, se han publicado varios métodos para coccidiostáticos en piensos no medicados después de la Directiva Europea 2009/08/EC (Valese y col., 2017; Pietruk y col., 2015; Cronly y col., 2011; Boscher y col., 2010). Sin embargo, en la literatura científica se encuentran pocos métodos para el análisis de sulfonamidas en piensos no destinatarios (Valese y col., 2017; Lopes y col., 2012; Boscher y col., 2010).

Considerando el 7º informe ESVAC que indica que el 51% de las sulfonamidas vendidas, ha sido en forma de premezclas medicamentosas y que éstas se emplean para la fabricación de piensos medicamentosos, es de esperar que la contaminación cruzada de sulfonamidas también puede ocurrir en las fábricas de piensos, tal y como ocurre con los coccidiostáticos. Asimismo, hay que resaltar que el Reglamento 2019/4/UE establece hasta 28 de enero de 2023 para fijar LM para residuos de sulfonamidas y otros antimicrobianos así como métodos de análisis de estos principios activos en los piensos.

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo es presentar un método de extracción simple para la determinación simultánea de coccidiostáticos y sulfonamidas por HPLC-MS/MS. Los compuestos susceptibles de ser incluidos en el método son los que se indican en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Coccidiostaticos y Sulfonamidas objeto de estudio

| Coccidiostáticos  | Sulfonamidas  |
|---|---|
| Decoquinato, lasalocid, maduramicina, monensina, narasina, robenidina, salinomicina | Sulfadiazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfapiridazina, sulfaclopiridazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol, trimetoprim |

### 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo

Sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfametoxipiridazina, sulfapiridazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol, trimetoprim, decoquinato, lasalocid, maduramicina, monensina, narasina, robenidina, salinomicina, diclazuril, nicarbacin, robenidina-d<sub>8</sub>, sulfadimetoxina-d<sub>8</sub> y sulfadiazina-d<sub>6</sub> (pureza >98%) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis, US). Sulfato magnésico anhidro (MgSO<sub>4</sub>; grado analítico) y cloruro de sodio (NaCl) también fueron adquiridos de Sigma. Acetonitrilo y metanol (grado HPLC) fueron obtenidos de Scharlau Chemie (Barcelona, España), así como el cloroformo y el dimetilsulfóxido. El ácido fórmico y el acetato de amonio (pureza >99%), se obtuvieron a través de Acros Organics (Geel, Bélgica). El agua empleada para la preparación de disoluciones se obtuvo en el laboratorio con un sistema de purificación de agua Milli-Q® de Millipore (Bedford, EEUU). El gas nitrógeno que se empleó para concentrar los extractos de muestras se generó utilizando un generador de nitrógeno de Peak Scientific Instruments Ltd. (Chicago, EEUU).

Las sustancias farmacológicas fueron pesadas de manera precisa ( $\pm 0.1$  mg) para preparar soluciones patrón de los compuestos individuales a una concentración de 0,4 mg/ml en metanol, excepto el decoquinato, que fue disuelto en cloroformo. Estas soluciones se

mezclaron para obtener una solución de trabajo con el conjunto de todos los analitos seleccionados a 10 µg/ml. Las soluciones madre se almacenaron en oscuridad a una temperatura de -18 °C durante no más de un mes, previamente a su utilización, se homogeneizaron mediante ultrasonidos.

### **3.2.2. Equipamiento**

Los analitos fueron extraídos del pienso utilizando el siguiente equipamiento: un molinillo Moulinex Groupe SEB (Ecully, Francia), una centrífuga Kokusan, serie H-103N (Tokio, Japón), un agitador vórtex modelo MS2 Minishaker de IKA (Staufen, Alemania), un agitador orbital modelo G25 de New Brunswick Scientific (NJ, EEUU) y un evaporador Turbo Vap® II de Zyrmark (MA, EEUU). Los extractos fueron analizados en un equipo HPLC de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) acoplado a un espectrofotómetro de MS modelo API 2000<sup>TM</sup> de Applied Biosystems (Toronto, Canadá). El sistema HPLC-MS/MS se controló por medio del software Analyst 1.4.1 también de Applied Biosystems (Toronto, Canadá). La separación se llevó a cabo con una columna de HPLC Synergi 2,5 µm Polar-RP 100 Å (50 × 2,00 mm) conectada a una precolumna Polar-RP (4,0 × 2,0 mm) ambas de Phenomenex (Macclesfield, Reino Unido).

### **3.2.3. Condiciones HPLC-MS/MS**

Para la separación de los analitos se utilizó una fase móvil mezcla de dos disoluciones; la A contenía 0,1% de ácido fórmico en agua y la B 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo. El programa de gradiente empleado es el que se indica a continuación: 0-2 min, 98% A; 2-3 min, 85% A; 3-4 min, 75% A; 4-8 min, 55% A; 8-9 min, 50% A; 9-14 min, 30% A; 14-25 min, 7% A; 25-28 min, 0% A; 28-32 min, 75% A; 32-33 min, 100% A; and 32-36 min, 100% A.

El volumen de inyección fue 15  $\mu$ l, la temperatura de la columna se mantuvo durante todo el análisis a 24 °C y el flujo de la fase móvil a 0,175 ml/min. Se utilizó fase móvil recién preparada para cada tanda de muestras. La Tabla 3.3 resume los tiempos de retención ( $R_t$ ), los potenciales de ionización (DP), los potenciales de entrada (EP), el potencial de entrada a la celda de colisión (CEP), la energía de colisión (EC), y el potencial de salida de la celda (CXP), empleados para cada transición MRM. El tiempo entre transiciones fue 150 ms. El flujo de gas laminar, voltaje de ion spray, temperatura de la fuente, gas de ionización 1 y 2 se establecieron a 30 psi, 4500 V; 450 °C; 50 psi y 50 psi, respectivamente.



**Tabla 3.3.Rt, iones precursor y producto ((m/z)<sup>+</sup>), DP, EP, CEP, EC y CXP  
empleados para cada transición MRM**

|                       | Rt<br>(min) | (m/z) <sup>+</sup> |      | DP<br>(V) | EP<br>(V) | CEP<br>(V) | EC<br>(V) | CXP<br>(V) |
|-----------------------|-------------|--------------------|------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| Decoquinato           | 9,1         | 418,2              | 372* | 51        | 9         | 14         | 23        | 6          |
| Decoquinato           | 9,1         | 418,2              | 204  | 51        | 9         | 14         | 57        | 8          |
| Lasalocid             | 9,6         | 613,2              | 377* | 61        | 7         | 25         | 39        | 6          |
| Lasalocid             | 9,6         | 613,2              | 559  | 61        | 7         | 25         | 33        | 6          |
| Maduramicina          | 9,8         | 939,0              | 877* | 56        | 10        | 37         | 67        | 32         |
| Maduramicina          | 9,8         | 939,0              | 895  | 56        | 10        | 37         | 67        | 32         |
| Monensina             | 9,6         | 693,5              | 675* | 71        | 6         | 28         | 33        | 24         |
| Monensina             | 9,6         | 693,5              | 461  | 71        | 6         | 28         | 53        | 6          |
| Narasina              | 10,0        | 787,8              | 431* | 111       | 12        | 31         | 79        | 20         |
| Narasina              | 10,0        | 787,8              | 279  | 111       | 12        | 31         | 55        | 6          |
| Robenidina            | 8,3         | 333,0              | 137* | 46        | 9         | 15         | 31        | 2          |
| Robenidina            | 8,3         | 333,0              | 155  | 46        | 9         | 15         | 25        | 6          |
| Salinomicina          | 9,7         | 773,1              | 431* | 56        | 4         | 31         | 47        | 4          |
| Salinomicina          | 9,7         | 773,1              | 265  | 56        | 4         | 31         | 61        | 6          |
| Sulfaclopiridazina    | 6,7         | 284,7              | 92*  | 41        | 6         | 13         | 33        | 4          |
| Sulfaclopiridazina    | 6,7         | 284,7              | 156  | 41        | 6         | 13         | 17        | 4          |
| Sulfadiazina          | 6,0         | 250,8              | 107* | 46        | 6         | 12         | 31        | 4          |
| Sulfadiazina          | 6,0         | 250,8              | 156  | 46        | 6         | 12         | 19        | 4          |
| Sulfametazina         | 6,4         | 279,0              | 186* | 31        | 10        | 16         | 17        | 4          |
| Sulfametazina         | 6,4         | 279,0              | 156  | 31        | 10        | 16         | 21        | 4          |
| Sulfametizol          | 6,6         | 270,8              | 108* | 61        | 11        | 13         | 31        | 4          |
| Sulfametizol          | 6,6         | 270,8              | 92   | 61        | 11        | 13         | 35        | 4          |
| Sulfametoxazol        | 7,0         | 254,0              | 156* | 116       | 2         | 12         | 17        | 4          |
| Sulfametoxazol        | 7,0         | 254,0              | 108  | 116       | 2         | 12         | 29        | 4          |
| Sulfametoxipiridazina | 6,6         | 281,0              | 65*  | 56        | 6         | 13         | 65        | 4          |
| Sulfametoxipiridazina | 6,6         | 281,0              | 107  | 56        | 6         | 13         | 35        | 4          |
| Sulfapiridazina       | 6,1         | 249,0              | 108* | 26        | 8         | 12         | 33        | 10         |
| Sulfapiridazina       | 6,2         | 249,0              | 91   | 26        | 8         | 12         | 33        | 6          |
| Sulfaquinoxalina      | 7,2         | 301,0              | 92*  | 26        | 6         | 14         | 37        | 4          |
| Sulfaquinoxalina      | 7,3         | 301,0              | 108  | 26        | 6         | 14         | 35        | 4          |
| Sulfatiazol           | 6,0         | 256,0              | 92*  | 26        | 7         | 12         | 35        | 4          |
| Sulfatiazol           | 6,1         | 256,0              | 156  | 26        | 7         | 12         | 15        | 4          |
| Trimetoprim           | 6,3         | 291,0              | 275* | 31        | 12        | 14         | 33        | 8          |
| Trimetoprim           | 6,3         | 291,0              | 230  | 31        | 12        | 14         | 33        | 12         |

\*Transiciones MRM empleadas para la cuantificación

### 3.2.4. Extracción de muestras

Se utilizó pienso de caballos para las muestras control “blanco”, ya que este tipo de pienso no debería contener residuos de las sustancias de interés. Estas muestras fueron utilizadas para la preparación de matrices adicionadas con la mezcla de sulfonamidas y coccidiostáticos hasta obtener las siguientes concentraciones: 0; 100; 200; 300; 400 y 1000  $\mu\text{g/kg}$ . Para cada tanda de muestras, se prepararon piensos dopados con los analitos seleccionados para su cuantificación en muestra.

Después de homogeneizar la muestra de pienso moliéndola en un molinillo, 1 g de muestra se transfirió a un tubo de plástico Falcon de 50 ml, junto con 2,5 g de una mezcla de sales ( $\text{MgSO}_4\text{:NaCl}$  60:40 w/w) y se mezclaron con el pienso. Se añadieron 15 ml de solvente de extracción ( $\text{ACN:H}_2\text{O}$ ; 60:40 v/v) y se homogeneizaron en un agitador vortex. Seguidamente, las muestras se colocaron en un agitador orbital y se agitaron a 200 rpm durante 20 min después, se introdujeron en una centrífuga a 7000 rpm durante 10 min. Se transfirió a un tubo eppendorf 1 ml de la capa orgánica y se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de hexano.

Para la determinación de la sulfadiazina, se extrajeron 2 ml de la capa orgánica y se evaporaron a sequedad con flujo de nitrógeno, en un tubo de cristal cónico a 39 °C. Las muestras evaporadas se redisolviéron en 1 ml de metanol acidificadas con 0.1% de ácido fórmico y al igual que el conjunto de las muestras restantes, se transfirieron a tubos eppendorf y se les añadieron 300  $\mu\text{l}$  de hexano.

El tubo se agitó con ayuda de un agitador vortex y se dejó en la oscuridad hasta que las dos fases se separaron (5 min). La fase inferior se recogió con jeringas desechables y se pasó a través de un filtro de jeringa GHP Acrodisc® (0,2  $\mu\text{m}$ ; Waters Corporation, MA, EEUU), el extracto filtrado se transfirió a un vial ambar con un insert de 0,3 ml para su análisis. La Figura 3.1 muestra un cromatograma TIC (suma de todos los MRM de los analitos investigados en una muestra de pienso blanco), las Figuras 3.2 y 3.3 corresponden a los cromatogramas MRM de coccidiostativos y sulfonamidas,



respectivamente, en una muestra de pienso enriquecida con todos los  
analitos a una concentración final de 100 µg/kg.

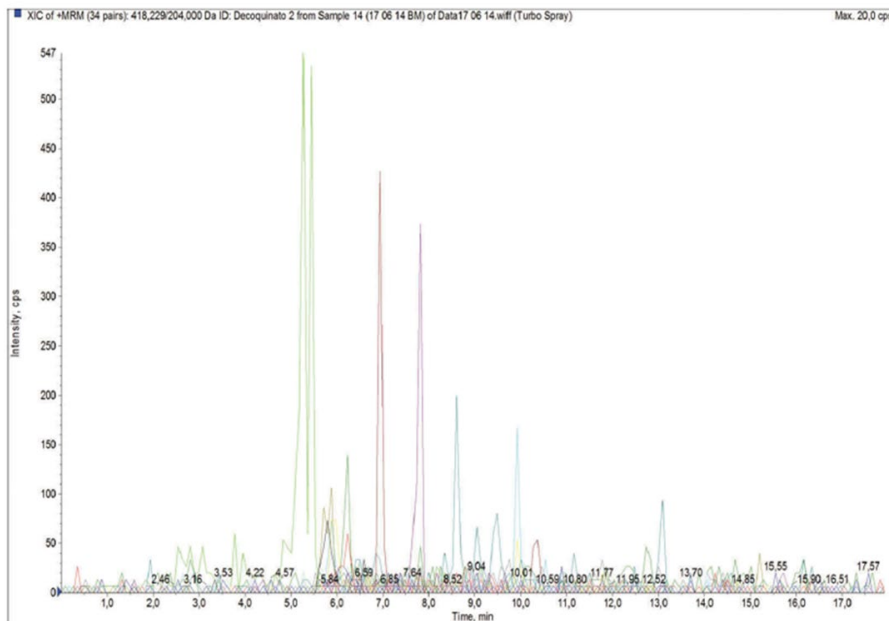


Figura 3.1. Cromatograma MRM de muestra de pienso blanco

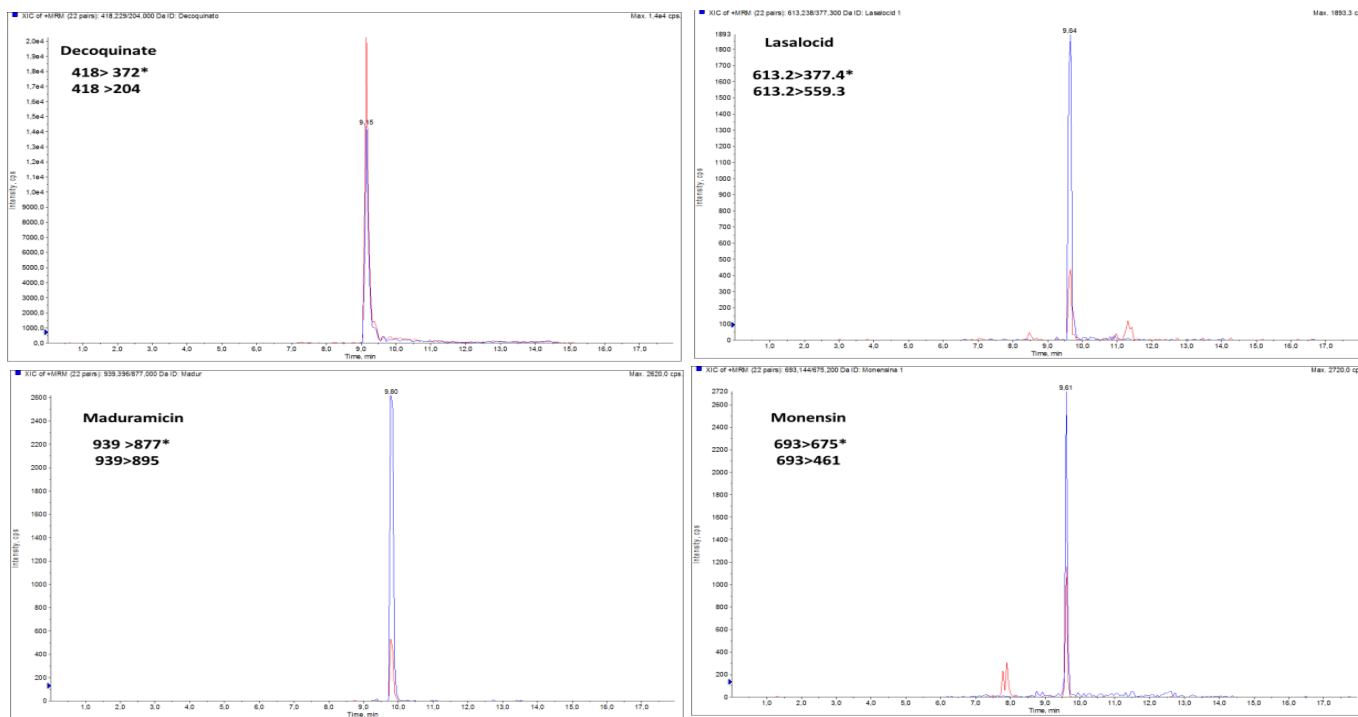


Figura 3.2. Cromatogramas MRM de los coccidiostáticos investigados en una muestra de pienso enriquecida con 100 µg/kg

## Desarrollo de un método para la determinación de residuos de coccidiostáticos y sulfonamidas en piensos

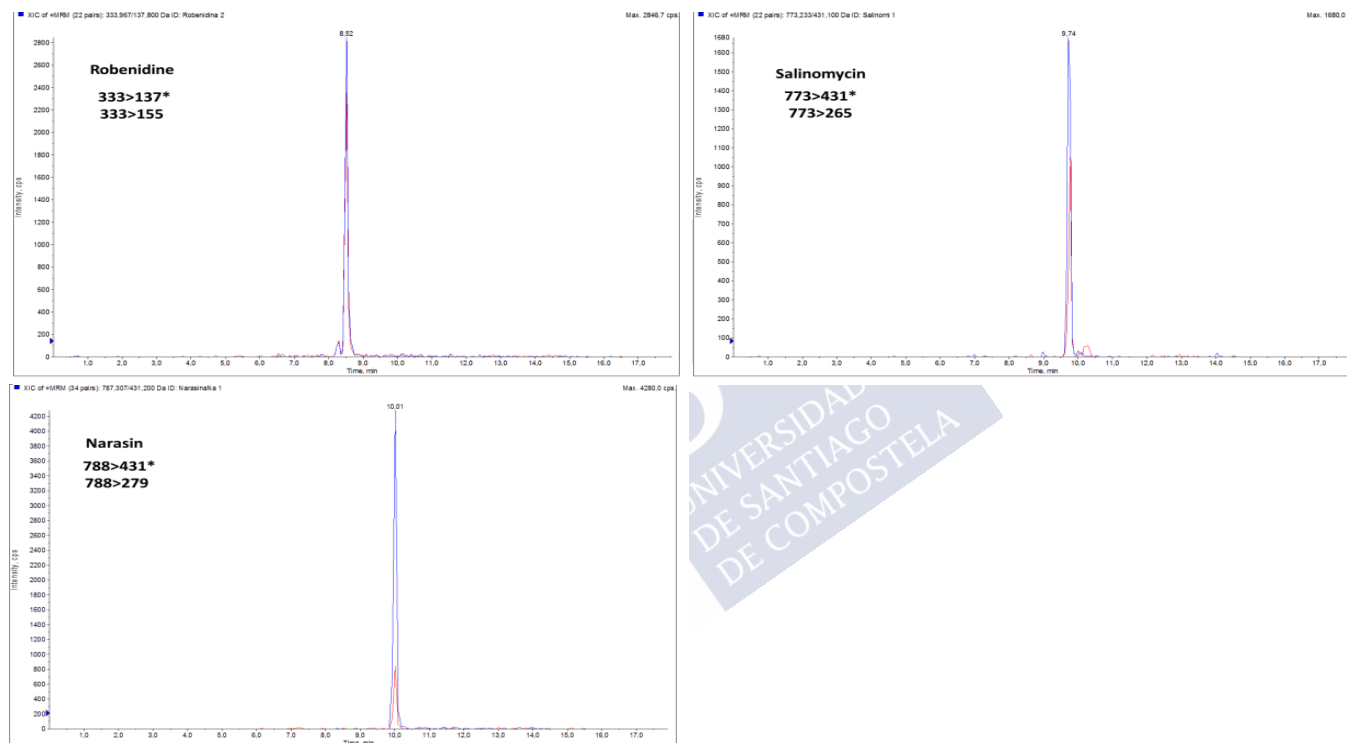


Figura 3.2. Continuación

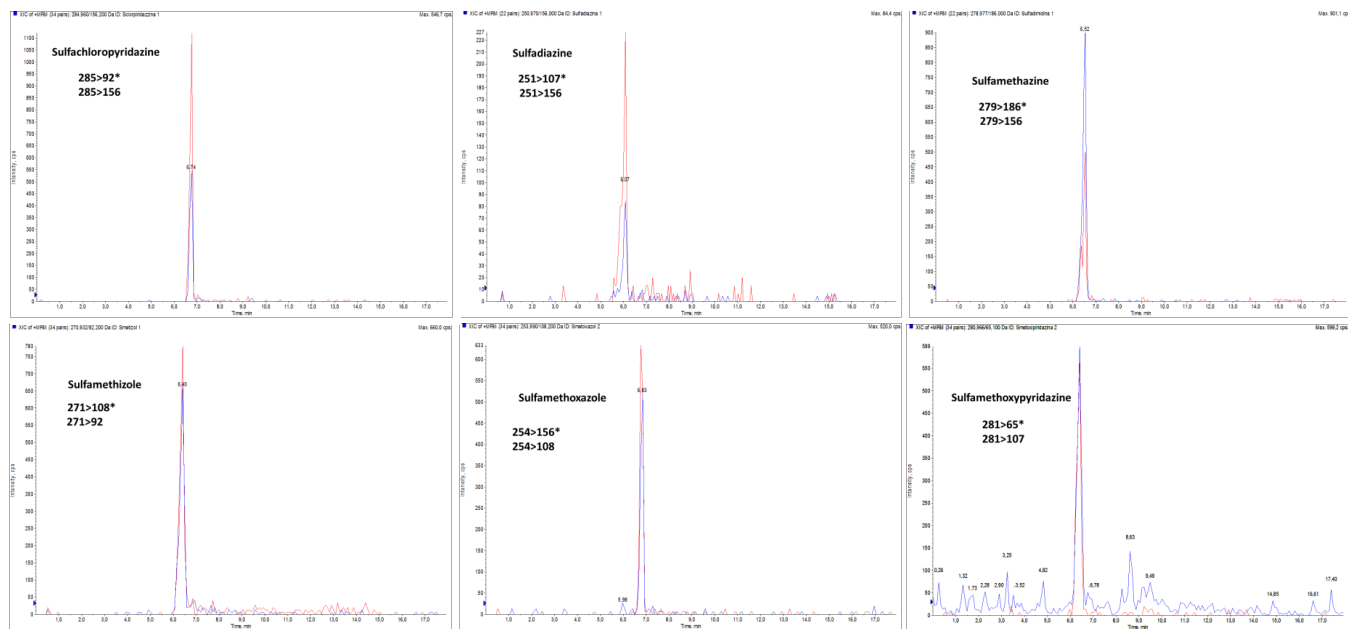


Figura 3.3. Cromatogramas MRM de las sulfonamidas y trimetoprim investigadas en una muestra de pienso dopada a 100 µg/kg

## Desarrollo de un método para la determinación de residuos de coccidiostáticos y sulfonamidas en piensos

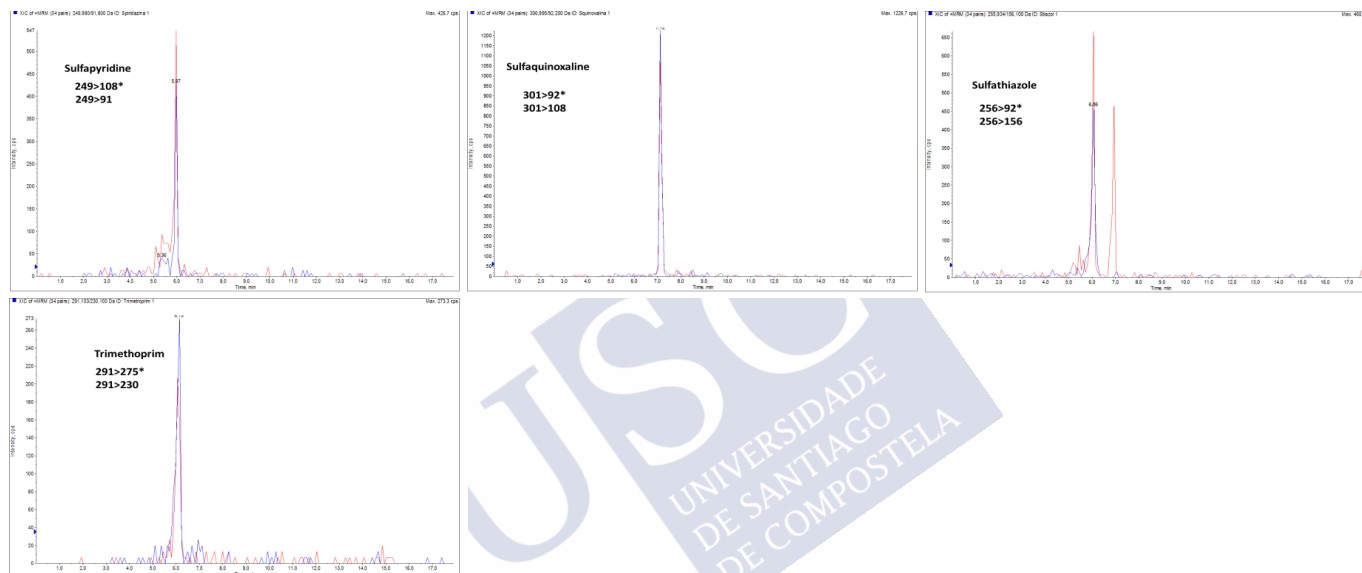


Figura 3.3. Continuación

### 3.2.5. Validación del método

De acuerdo con la Directiva 96/23/CE, el proceso de producción de animales y materias primas de origen animal deberá estar controlado para la detección de residuos de componentes activos en animales vivos, sus excrementos y sus fluidos corporales, así como en tejidos, productos de origen animal, alimentación animal y agua de bebida. Tal y como se mencionó en la Introducción (1.5.2 Métodos de detección y cuantificación), la Decisión 2002/657/CE es la legislación europea que establece reglas y criterios de validación. Así pues, el método presentado en este trabajo fue validado de acuerdo a los criterios incluidos en dicha Decisión. Los parámetros de validación que se evaluaron fueron: linealidad, recuperación, precisión (bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad), selectividad/especificidad, límite de detección (LDD), límite de cuantificación (LDC),  $CC\alpha$  y  $CC\beta$ .

La linealidad se verificó con curvas de calibración preparadas con muestras de pienso blancas, dopadas con los analitos a 0, 100, 200, 300, 400 y 1000  $\mu\text{g/kg}$ . Para cada fármaco se realizó una regresión lineal del área del pico del analito en cuestión frente a su concentración. El LDD y el LDC se evaluaron y verificaron utilizando muestras de pienso adicionadas con los compuestos, estableciéndose como LDD y LDC del método las concentraciones con una relación S/N superior a 3 y a 10, respectivamente.

Al no disponer de materiales de referencia, la recuperación y precisión de la medida se aseguraron con muestras de pienso blanco dopadas a cantidades conocidas de los fármacos (100, 200 y 300  $\mu\text{g/kg}$ ). Para la  $RSD_r$ , se prepararon seis réplicas de muestras de cada concentración y se analizaron en el mismo día. La concentración de los fármacos se calculó con una curva de calibración de muestras de pienso enriquecidas (0, 100, 200, 300, 400 y 1000  $\mu\text{g/kg}$ ). Este procedimiento se repitió en tres días diferentes para obtener los datos de precisión bajo condiciones de reproducibilidad. La recuperación se calculó empleando las muestras de los tres días.

La selectividad/especificidad del método desarrollado se investigó con 20 muestras de pienso blanco de diferentes especies de animales (ave, bovino, conejo, caprino y porcino) procedentes de fábricas de pienso y de estudios intercomparativos de Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Estas muestras también se doparon con los fármacos seleccionados al nivel de validación (200 µg/kg).

### **3.2.6. Muestras**

Se aplicó el método desarrollado en muestras de pienso tomadas de fábricas de pienso (50 muestras) y de granjas de leche ubicadas en Galicia (50 muestras). Las muestras de pienso obtenidas de los fabricantes estaban destinadas a diferentes especies animales (ave, bovino, conejo, ovino y caprino). Una vez en el laboratorio, las muestras se trituraron y se mantuvieron en envases de plástico en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su análisis.

Además, se emplearon muestras de pienso de los Programas de Test de Competencia de AAFCO de los años 2016 y 2017 con el objetivo de verificar el método desarrollado.

## **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS**

Tanto el decoquinato como el lasalocid, la maduramicina, la monensina, la narasina, la robenidina y la salinomicina pertenecen al grupo terapéutico de los coccidiostáticos, de cualquier modo, sus propiedades químicas son muy diferentes. Esto queda patente en el momento en que se preparan las soluciones patrón, ya que por ejemplo, la mayoría de los coccidiostáticos se disuelven fácilmente en metanol, pero el decoquinato es necesario disolverlo en cloroformo. Además, en la literatura científica se comprueba que el diclazuril y la nicarbacina se detectan mediante ESI en modo negativo, mientras que

los otros coccidiostáticos se detectan en modo (Vudathala and Murphy y col., 2012; Delahaut y col., 2010; Olejnik y col., 2009; Shao y col., 2009). El método presentado aquí sólo es aplicable para compuestos que pueden ser detectados con ESI en modo positivo para evitar el cambio entre ionización positiva y negativa durante el análisis cromatográfico y de esta forma proteger la durabilidad del capilar de la fuente de electrospray. Se infundieron soluciones patrón de compuestos individuales a 1 µg/ml en el MS a un flujo de 10 µl/ml para la selección de un ión precursor y de dos iones producto (Tabla 3.3, Sección 3.2.3). Se eligieron los iones que presentaron un ratio señal/ruido más alto. En general, el ion precursor fue la molécula protonada, pero para el lasalocid, maduramicina, monensina, narasina y salinomycin, se empleó el aducto de sodio ( $M+Na$ )<sup>+</sup> tal y como se ha descrito en trabajos anteriores (Martínez-Villalba y col., 2009; Dubois y col., 2004). La mejor resolución entre picos y forma de éstos se obtuvo usando como fases móviles agua y acetonitrilo acidificados con 0,1% de ácido fórmico. Estas fases móviles se utilizan comúnmente para análisis de sulfonamidas y coccidiostáticos independientemente de la matriz, aunque se han publicado métodos analíticos con metanol en vez de acetonitrilo (Mortier y col., 2003; Moloney y col., 2012; Delahaut y col., 2010; Hoff y col., 2015; Shao y col., 2009; Vincent y col., 2008; Chang y col., 2008). Además, se han publicado métodos para los analitos seleccionados que emplean una combinación de ácido fórmico y acetato de amonio con agua o acetonitrilo (Pereira y col., 2016) y acetonitrilo y metanol con formiato amónico (Olejnik y col., 2009).

Para los análisis de coccidiostáticos y sulfonamidas se han empleado diversas de columnas de HPLC C18, que incluyen columnas tales como Symmetry<sup>®</sup> (Mortier y col., 2003), Purospher<sup>®</sup> (Delahaut y col., 2010), Nucleosil<sup>®</sup> (Vincent y col., 2008), Luna<sup>®</sup>, Zorbax Eclipse XDB (Lopes y col., 2012, Boscher y col., 2010), Shim-Pack XR-ODS (Wang y col., 2016) y Purospher<sup>®</sup> STAR (Hoff y col., 2015). Para la identificación de cada uno de los compuestos, se emplearon dos transiciones MRM y el tiempo de retención; de este modo, se cumple con los cuatro puntos de identificación exigidos en la Decisión 2002/657/CE (Tabla 3.3, Sección 3.2.3). Las transiciones MRM que



presentaron el ratio señal/ruido (S/N) más alto fueron empleadas para la cuantificación. Las transiciones seleccionadas coinciden con las publicadas por otros autores. Por ejemplo, para decoquinato, 418 m/z fue el ión precursor y 372 y 204 m/z los iones productos (Olejnik y col., 2009; Maloney y col., 2012; Pietruk y col., 2015), para lasalocid 613 m/z fue el ión precursor y 377 y 577 m/z fueron los iones productos (Pereira y col., 2016; Pietruk y col., 2015), para la salinomicina 773 m/z fue el ión precursor y 431 y 265 m/z fueron los iones productos (Olejnik y col., 2009), para monensina 693 m/z fue el ión precursor y 675 y 461 m/z los iones productos (Rokka y al., 2006; Pietruk y col., 2015); para sulfadiacina, 251 fue el ión precursor y 156 y 108 m/z los iones productos (Martins y col., 2015; Li y col., 2017) y para sulfatiazol 256 fue el ión precursor y 156 y 92 m/z fueron los iones productos (Li y col., 2017).

### **3.3.2. Optimización del protocolo de extracción**

La composición de los piensos depende de la edad y del animal al que van destinados. Las materias primas empleadas en mayor cantidad en España durante 2015 en la producción de piensos fueron los granos de cereales y productos derivados (66%) seguidos de oleaginosas y productos derivados (16%), minerales y productos derivados de ellos (4%), aceites y grasas (3%), forrajes y fibra celulósica y productos derivados de éstos (3%) y tubérculos y raíces (2%) (MAPAMA, 2016). Por ello, considerando esta variada mezcla de ingredientes, cabe esperar que el desarrollo de un protocolo de extracción adecuado que permita la identificación y cuantificación de sulfonamidas y coccidiostáticos en matrices de piensos resulte laborioso.

En la bibliografía científica consultada se encuentran descritos diversos métodos para el análisis de coccidiostáticos en piensos, particularmente, después de la publicación de la Directiva Europea 2009/8/CE, que establece los LM de coccidiostáticos en piensos no aditivados (Rokka y Peltonen, 2006; Olejnik y col., 2009; Boscher y col., 2010; De la Huebra y col., 2010; Delahaut y col., 2010; Cronly y

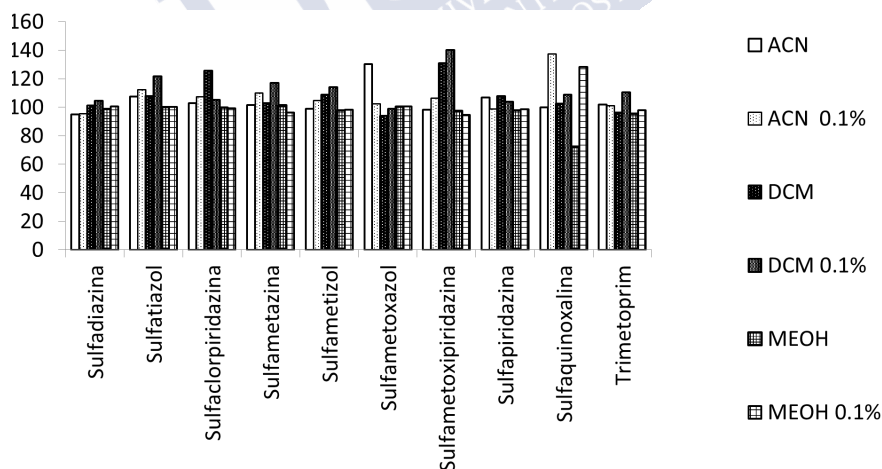
col., 2011; Pietruk y col., 2015). En contraste, casi no se encuentran métodos para el análisis de residuos de sulfonamidas en piensos no destinatarios. Boscher y col. (2010) publicó un método para la extracción de 33 analitos que incluye una sulfonamida (sulfadiazina) y emplea para la extracción de todos los analitos una mezcla de metanol/acetonitrilo/tampón McIlvaine, seguidos de la purificación del extracto con PSA (amina primaria secundaria) (Boscher y col., 2010). Otro método demostró poder cuantificar satisfactoriamente 13 sulfonamidas con agua, acetonitrilo, metanol y sales ( $\text{MgSO}_4$  y  $\text{NaCl}$ ), seguidos por PSA para la limpieza del extracto (Lopes y col., 2012). Por otro lado, en relación a los protocolos de extracción de coccidiostáticos, se encuentra información de extracciones simples con metanol (Olejnik y col., 2009; Mortier y col., 2003; Vincent y col., 2008), acetonitrilo (De la Huebra y col., 2010; Rokka y col., 2013; Olejnik y col., 2009), acetonitrilo o metanol con agua y sales (Cronly y col., 2011; Delahaut y col., 2010) o acetonitrilo acidificado (Boix y col., 2014). Todos estos métodos recurren a la agitación, centrifugación, filtración y análisis del extracto resultante. Otros métodos incluyen la purificación del extracto obtenido en la primera extracción con sílica o cartuchos C18 modificados (Vincent y col., 2008; Kot-Wasik y col., 2005; Matabudul y col., 2002).

Teniendo en cuenta los protocolos publicados previamente para sulfonamidas y coccidiostáticos en piensos no aditivados y no destinatarios, se probaron diferentes procedimientos para reducir el número de pasos durante la extracción con el objetivo de disminuir el solvente orgánico utilizado, así como la complejidad del método, pero siempre manteniendo una buena sensibilidad y reproducibilidad.

Para el desarrollo del método que se presenta en este trabajo se investigaron los siguientes factores: cantidad de muestra (10; 5; 2 y 1 g), solvente de extracción (metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, etanol, diclorometano, agua, hexano y combinaciones de algunos de ellos a diferentes porcentajes, desde 100% hasta 10%), uso o no de ultrasonidos, tipo de agitación (agitador automático o agitador orbital), tiempo y velocidad de centrifugación y volumen final del extracto. Las pruebas de extracción se llevaron a cabo con muestras de pienso

dopadas con los analitos seleccionados para obtener una concentración final de 50, 100, 250, 500 y 750  $\mu\text{g/kg}$ .

La Figura 3.4 muestra los principales porcentajes de recuperación para las sulfonamidas extraídas con acetonitrilo, acetonitrilo acidificado, metanol, metanol acidificado, diclorometano y diclorometano acidificado. En general, se obtuvieron buenas recuperaciones con todos los solventes probados. Por lo tanto, se compararon las recuperaciones y la repetibilidad obtenidas para la concentración más baja (50  $\mu\text{g/kg}$ ), obteniéndose las recuperaciones más altas con acetonitrilo. Con el diclorometano y el diclorometano acidificado se obtuvieron recuperaciones por encima de un 100% para sulfadimidina, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametizol, sulfametoxipiridazina y sulfapiridacina. Por otro lado, comparando acetonitrilo y metanol, acidificados y no, se observa que las recuperaciones fueron más elevadas y siempre dentro de los valores establecidos por la Decision 2002/657/CE, con acetonitrilo sin acidificar. El empleo de acetonitrilo acidificado se descartó por la inestabilidad del extracto resultante.



**Figura 3.4. Porcentaje de recuperación de las sulfonamidas con distintos disolventes**

Una vez decidido el tipo de solvente orgánico, acetonitrilo, se observó al aplicar el método en piensos de diferentes especies de animales un efecto matriz. Por ello, después de consultar la bibliografía científica, se optó por probar un protocolo que emplease bajo volumen de solvente orgánico (acetonitrilo) y la adición de sales ( $\text{MgSO}_4$  y  $\text{NaCl}$ ). Con la adopción de estas medidas se obtuvieron mejores resultados que empleando únicamente acetonitrilo.

Después de estas incorporaciones al protocolo de extracción, en comparación con otros, la etapa de pesar las muestras y las sales supuso la parte más laboriosa de la extracción. Dado que las muestras sólo necesitan agitación durante un tiempo de 20 min y centrifugación durante 15 min, en general, el proceso completo de extracción de 15 muestras y 6 muestras de matriz dopada, no debería llevar más de 4 horas. Además, sólo se necesitan 10 ml de solvente orgánico y los residuos generados son también reducidos. El protocolo definitivo de extracción queda reflejado en la Figura 3.5.

## Desarrollo de un método para la determinación de residuos de coccidiostáticos y sulfonamidas en piensos



Figura 3.5. Protocolo de extracción de coccidiostáticos y sulfonamidas en piensos a nivel de traza

### 3.3.3. Validación del método

El método fue validado de acuerdo a los requerimientos de la Decisión 2002/657/CE. Los parámetros de validación obtenidos durante la validación se enumeran en la Tabla 3.4 y en la Tabla 3.5. Debido a la ausencia de material certificado de referencia para todos los analitos investigados, el método se validó utilizando la recuperación de cantidades conocidas de los analitos seleccionados. Los valores de  $RSD_r$  y  $RSD_R$  y las incertidumbres se determinaron utilizando también muestras de pienso blanco adicionadas con las sustancias farmacológicas.

$CC\alpha$  y  $CC\beta$  se calcularon de manera diferente para sulfonamidas y para coccidiostáticos, ya que según la Decisión 2002/657/CE las ecuaciones para calcular  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  en sustancias prohibidas (sulfonamidas) son distintas que para sustancias que tienen un LM establecido, como es el caso de los coccidiostáticos (Tabla 3.1, Sección 3.2.3). Las sulfonamidas no están permitidas y consecuentemente no tienen LM en piensos no destinatarios. Para ambos grupos de fármacos se empleó la desviación estándar media de tres concentraciones (100, 200 y 300  $\mu\text{g/kg}$ ).

**Tabla 3.4. Recuperación (%), RSD<sub>r</sub>, RSD<sub>R</sub>, LM (µg/kg), CCα (µg/kg), CCβ (µg/kg), LDD (µg/kg) y LDC (µg/kg) de los coccidiostáticos**

|                   |       | Recupe-<br>ración | RSD <sub>r</sub> | RSD <sub>R</sub> | LM   | CCα  | CCβ  | LDD | LDC |
|-------------------|-------|-------------------|------------------|------------------|------|------|------|-----|-----|
| Decoqui-<br>nato  | 100   | 91                | 7                | 11               | 1200 | 1225 | 1225 | 20  | 60  |
|                   | 200   | 98                | 3                | 7                | 400  | 425  | 451  |     |     |
|                   | 300   | 97                | 7                | 7                |      |      |      |     |     |
|                   | Media | 95                | 5                | 9                |      |      |      |     |     |
| Lasalocid         | 100   | 92                | 12               | 19               | 1250 | 1324 | 1398 | 50  | 100 |
|                   | 200   | 126               | 17               | 20               | 3750 | 3824 | 3898 |     |     |
|                   | 300   | 87                | 23               | 20               |      |      |      |     |     |
|                   | Media | 102               | 17               | 20               |      |      |      |     |     |
| Madura-<br>micina | 100   | 101               | 16               | 20               | 50   | 89   | 128  | 10  | 40  |
|                   | 200   | 121               | 3                | 8                | 150  | 189  | 228  |     |     |
|                   | 300   | 99                | 9                | 9                |      |      |      |     |     |
|                   | Media | 107               | 9                | 12               |      |      |      |     |     |
| Monensina         | 100   | 98                | 15               | 17               | 1250 | 1294 | 1338 | 20  | 50  |
|                   | 200   | 116               | 13               | 13               | 3750 | 3794 | 3838 |     |     |
|                   | 300   | 101               | 14               | 12               |      |      |      |     |     |
|                   | Media | 105               | 14               | 14               |      |      |      |     |     |
| Narasina          | 100   | 78                | 7                | 15               | 700  | 743  | 786  | 20  | 50  |
|                   | 200   | 85                | 14               | 16               | 2100 | 2143 | 2186 |     |     |
|                   | 300   | 98                | 8                | 12               |      |      |      |     |     |
|                   | Media | 86                | 10               | 14               |      |      |      |     |     |
| Robenidina        | 100   | 106               | 16               | 12               | 700  | 727  | 754  | 20  | 50  |
|                   | 200   | 103               | 4                | 6                | 2100 | 2127 | 2154 |     |     |
|                   | 300   | 89                | 7                | 8                |      |      |      |     |     |
|                   | Media | 99                | 9                | 9                |      |      |      |     |     |
| Salinomi-<br>cina | 100   | 103               | 14               | 17               | 700  | 740  | 780  | 20  | 50  |
|                   | 200   | 100               | 9                | 13               | 2100 | 2140 | 2180 |     |     |
|                   | 300   | 116               | 8                | 10               |      |      |      |     |     |
|                   | Media | 106               | 10               | 13               |      |      |      |     |     |

**Tabla 3.5. Recuperación (%), RSD<sub>r</sub>, RSD<sub>R</sub>, CC<sub>α</sub> (μg/kg), CC<sub>β</sub> (μg/kg), LDD (μg/kg) y LDC (μg/kg) de las sulfonamidas y trimetoprim**

|                            |       | Recupe-<br>ración | RSD <sub>r</sub> | RSD <sub>R</sub> | CC <sub>α</sub> | CC <sub>β</sub> | LDD | LDC |
|----------------------------|-------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----|-----|
| Sulfactor-<br>piridazina   | 100   | 84                | 20               | 21               | 72              | 151             | 25  | 50  |
|                            | 200   | 95                | 14               | 26               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 104               | 15               | 19               |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 94                | 16               | 22               |                 |                 |     |     |
| Sulfadiazina               | 100   | 109               | 12               | 19               | 32              | 102             | 25  | 50  |
|                            | 200   | 99                | 8                | 12               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 98                | 11               | 10               |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 103               | 10               | 14               |                 |                 |     |     |
| Sulfametazina              | 100   | 97                | 10               | 8                | 75              | 100             | 50  | 75  |
|                            | 200   | 90                | 6                | 11               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 101               | 8                | 7                |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 96                | 8                | 9                |                 |                 |     |     |
| Sulfametizol               | 100   | 82                | 22               | 31               | 102             | 206             | 75  | 100 |
|                            | 200   | 109               | 9                | 30               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 108               | 9                | 21               |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 100               | 13               | 27               |                 |                 |     |     |
| Sulfameto-<br>xazol        | 100   | 84                | 41               | 25               | 49              | 119             | 25  | 50  |
|                            | 200   | 109               | 13               | 16               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 102               | 15               | 19               |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 103               | 23               | 20               |                 |                 |     |     |
| Sulfametoxi-<br>piridazina | 100   | 97                | 10               | 21               | 89              | 172             | 50  | 75  |
|                            | 200   | 90                | 9                | 22               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 107               | 28               | 22               |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 98                | 16               | 21               |                 |                 |     |     |
| Sulfapiridazina            | 100   | 79                | 48               | 70               | 247             | 475             | 50  | 75  |
|                            | 200   | 102               | 31               | 42               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 87                | 30               | 48               |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 89                | 36               | 53               |                 |                 |     |     |
| Sulfaquino-<br>xalina      | 100   | 98                | 20               | 24               | 75              | 137             | 50  | 75  |
|                            | 200   | 107               | 7                | 18               |                 |                 |     |     |
|                            | 300   | 113               | 13               | 23               |                 |                 |     |     |
|                            | Media | 107               | 13               | 22               |                 |                 |     |     |



Tabla 3.6. Continuación

|             |       | Recupe-<br>ración | RSDr | RSDR | CC $\alpha$ | CC $\beta$ | LDD | LDC |
|-------------|-------|-------------------|------|------|-------------|------------|-----|-----|
| Sulfatiazol | 100   | 111               | 21   | 21   | 76          | 151        | 50  | 75  |
|             | 200   | 101               | 23   | 22   |             |            |     |     |
|             | 300   | 111               | 15   | 18   |             |            |     |     |
|             | Media | 108               | 20   | 20   |             |            |     |     |
| Trimetoprim | 100   | 196               | 21   | 21   | 76          | 151        | 50  | 75  |
|             | 200   | 101               | 23   | 22   |             |            |     |     |
|             | 300   | 106               | 15   | 18   |             |            |     |     |
|             | Media | 134               | 20   | 20   |             |            |     |     |

Inicialmente, los LDD y LDC de cada analito se estimaron para calcular la repetibilidad. Después, se comprobó con muestras de pienso dopadas la relación S/N. Las concentraciones que dieron una S/N por encima de 3 y 10 fueron establecidas definitivamente como LDD y LDC, respectivamente. En todos los casos, el LDD y el LDC estaban por debajo de los valores de CC $\alpha$  y de CC $\beta$  (Tabla 3.3 y Tabla 3.4).

Los porcentajes de recuperación se calcularon como la cantidad medida dividida por el nivel de fortificación y multiplicado por 100. La Tabla 3.3 y la Tabla 3.4 agrupan las principales recuperaciones obtenidas durante los tres días de la validación y a tres concentraciones para coccidiostáticos y sulfonamidas, respectivamente. Los valores de recuperación se situaron entre los límites de -18% y +10% establecidos en la normativa europea. De manera similar, la repetibilidad y la reproducibilidad calculadas con muestras adicionadas fueron aceptables, en base a la Decisión 2002/657/CE (entre 23 y 16%). Aunque las sulfonamidas fueron extraídas fácilmente con las condiciones ensayadas, este grupo obtuvo valores más bajos de repetibilidad y reproducibilidad. Esto podría deberse a que son menos estables que los coccidiostáticos por su sensibilidad a la luz y/o a la temperatura.

La selectividad/especificidad se evaluó con muestras de pienso blancas de diferentes especies animales adicionadas con todos los compuestos ensayados al nivel de validación (200 µg/kg). El método demostró ser específico para los coccidiostáticos y las sulfonamidas seleccionados y fue capaz de identificar cada compuesto utilizando las dos transiciones MRM seleccionadas y sin la presencia de picos interferentes en los Rt de los analitos. El Reglamento 574/2011 contempla también límites para el bromhidrato de halofuginona y la semduramicina, aunque estos dos compuestos no resultaron de interés para las fábricas de pienso implicadas en este proyecto de investigación y por lo tanto, no se incluyeron en el método.

#### **3.3.4. Resultados de las muestras analizadas**

Se tomaron muestras de pienso en granjas de vacuno de leche y en fábricas de piensos. Las sulfonamidas se detectaron con mayor frecuencia en muestras tomadas de las granjas, siendo la sulfadiazina la única sulfonamida detectada. Este compuesto se midió a concentraciones entre 50 y 304 µg/kg en un total de 39% muestras de granjas y 36% muestras de fábricas. Es por tanto, destacable la contaminación cruzada de esta sulfonamida en pienso. Además, de acuerdo con la legislación europea, estas muestras no son aptas para ser consumidas por animales de abasto, ya que la presencia de sulfonamidas está prohibida en piensos no destinatarios.

Los resultados obtenidos para sulfadiazina concuerdan con los datos aportados por Croubels y col. (2002), que midieron sulfadiazina en 27% de muestras de pienso, los ensayos llevados a cabo en piensos de diferentes especies animales recogidos en fábricas dieron como resultado sulfadiazina en el 50% de los piensos de vacuno y el 19 % de los piensos de las especies animales consideradas (porcino, pollo y vacuno).

En lo que se refiere a la presencia de coccidiostáticos, se detectó decoquinato en una única muestra tomada en una granja de vacuno de leche a una concentración de 114  $\mu\text{g/kg}$ , siendo menor que el LM (1200  $\mu\text{g/kg}$ ) establecido para esta especie por el Reglamento 574/2011. En las muestras de fábricas, se detectó la presencia de narasina, monensina y salinomicina en el 30%, 15% y 5%, de las muestras respectivamente. Tanto la narasina como la salinomicina se cuantificaron en una sola ocasión por encima del LM permitido.

La diferencia en la frecuencia de detección entre los coccidiostáticos y las sulfonamidas, y en particular con la sulfadiazina durante la producción de piensos, podría deberse a las características químicas de cada uno de los compuestos investigados, además de la ausencia de legislación específica para sulfonamidas en piensos y consecuentemente, a un menor control que para coccidiostáticos.

También se emplearon muestras de pienso de los Programas de Test de Competencia de AAFCO de los años 2016 y 2017 con el objetivo de verificar el método desarrollado. Estas muestras incluían salinomicina (1 mg/kg), lasalocid (entre 4 y 0,6 mg/kg) y monensina (entre 8 y 3 mg/kg). Para estas muestras, se obtuvieron valores de z-score menores de 1,5 para cada uno de los compuestos, siendo 2 el valor máximo aceptado. Los datos obtenidos de las muestras indican que el método podría aplicarse fácilmente a piensos de diferentes especies animales sin verse afectadas por la composición del pienso (la cantidad de proteína, grasa, hidratos de carbono y compuestos inorgánicos). No obstante, cabe mencionar que el método no dio resultados satisfactorios para concentraciones superiores a 20 mg/kg para ninguno de los compuestos estudiados, debido a que surgen problemas de saturación de la señal cromatográfica.

### 3.4. CONCLUSIONES

Como queda demostrado, los coccidiostáticos son susceptibles de dar lugar a contaminación cruzada, por lo que como consecuencia de este trabajo, se ha desarrollado un método barato y sencillo para la detección de sustancias del grupo de aditivos de piensos y del grupo de fármacos veterinarios usados en producción animal.

El método analiza simultáneamente la presencia de residuos de 17 fármacos (decoquinato, lasalocid, maduramicina, monensina, narasina, robenidina, salinomicina, sulfaclopiridacina, sulfadiazina, sulfametacina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridacina, sulfapiridacina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol y trimetoprim) en piensos con buena reproducibilidad y ha sido validado siguiendo los criterios de la Decisión 2002/657/CE, por lo que permite su aplicación para el control de muestras oficiales en laboratorios de referencia en la UE.

Este método se aplicó satisfactoriamente a 50 muestras de pienso recogidas en granjas de vacuno de leche, 50 muestras de fábricas de pienso y 10 muestras de piensos de ensayos intercomparativos. Los análisis de las muestras de granjas y de fábricas para los grupos de sustancias investigados indicaron una mayor prevalencia de sulfonamidas, en concreto de sulfadiazina, lo que posiblemente se deba a un menor control de estas sustancias a niveles residuales. Hay que resaltar que el consumo reiterado de muestras con bajos niveles de antimicrobianos podría dar lugar al desarrollo de bacterias con genes de resistencias, causando problemas en futuros tratamiento de los animales o incluso de seguridad alimentaria.

### 3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J. V., León, N., Yusá, V., Hernández, F. (2014). Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food chemistry*, 160, 313-320.

Boscher, A., Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., Bohn, T. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6394-6404.

Capurro, E., Danaher, M., Anastasio, A., Cortesi, M. L., O’Keeffe, M. (2005). Efficient HPLC method for the determination of nicarbazin, as dinitrocarbanilide in broiler liver. *Journal of chromatography B*, 822(1-2), 154-159.

Chang, H., Hu, J., Asami, M., Kunikane, S. (2008). Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2), 390-393.

Cronly, M., Behan, P., Foley, B., Malone, E., Shearan, P., Regan, L. (2011). Determination of eleven coccidiostats in animal feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry at cross contamination levels. *Analytica chimica acta*, 700(1-2), 26-33.

Croubels, S., Wassink, P. De Backer, P. (2002). Simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim in animal feed by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 473(1-2), 183-194.

De la Huebra, M. J. G., Vincent, U., Von Holst, C. (2010). Determination of semduramicin in poultry feed at authorized level by

liquid chromatography single quadrupole mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(4), 860-868.

Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del consejo en cuanto a los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de la Comunidad Europea*, L221; 17 de agosto de 2002; 8–36.

Delahaut, P., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., Gillard, N. (2010). Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC–MS/MS. *Food Additives and Contaminants*, 27(6), 801-809.

Directiva 2009/8/CE de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que modifica el Anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por lo que respecta a los contenidos máximos de coccidiostáticos o histomonóstatos presentes, como resultado de una transferencia inevitable, en los piensos a los que no están destinadas dichas sustancias. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L40; 11 de febrero de 2009;19-25.

Dmitrienko, S. G., Kochuk, E. V., Apyari, V. V., Tolmacheva, V. V., Zolotov, Y. A. (2014). Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection—a review. *Analytica chimica acta*, 850, 6-25.

Dubois, M., Pierret, G., Delahaut, P. (2004). Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 813(1-2), 181-189.

European Medicines Agency (2017). European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015*. (EMA/184855/2017). Accedido en octubre de 2017 a través de [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf)

Galarini, R., Fioroni, L., Moretti, S., Pettinacci, L., Dusi, G. (2011). Development and validation of a multi-residue liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. *Analytica chimica acta*, 700(1-2), 167-176.

Galarini, R., Fioroni, L., Angelucci, F., Tovo, G. R. y Cristofani, E. (2009). Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8158-8164.

Hoff, R. B., Pizzolato, T. M., Peralba, M. D. C. R., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2015). Determination of sulfonamide antibiotics and metabolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC–QqLIT-MS/MS). *Talanta*, 134, 768-778.

Kot-Wasik, A., Wasik, A. (2005). Determination of robenidine in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction. *Analytica chimica acta*, 543(1-2), 46-51.

Li, X., Yu, H., Peng, R., Gan, P. (2017). Determination of 19 sulfonamides residues in pork samples by combining QuEChERS with dispersive liquid–liquid microextraction followed by UHPLC–MS/MS. *Journal of separation science*, 40(6), 1377-1384.

Lopes, R. P., de Freitas Passos, É. E., de Alkimim Filho, J. F., Vargas, E. A., Augusti, D. V., Augusti, R. (2012). Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC–MS/MS analysis. *Food Control*, 28(1), 192-198.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2016). *Datos de producción de piensos 2016*. Subdirección General De Medios De Producción Ganaderos. Madrid, España.

Martínez-Villalba, A., Moyano, E. y Galceran, M. T. (2009). Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(9), 1255-1263.

Martins, M. T., Barreto, F., Hoff, R. B., Jank, L., Arsand, J. B., Feijó, T. C., Schapoval, E. E. S. (2015). Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 32(3), 333-341.

Matabudul, D. K., Lumley, I. D., Points, J. S. (2002). The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst*, 127(6), 760-768.

Moloney, M., Clarke, L., O'Mahony, J., Gadaj, A., O'Kennedy, R., Danaher, M. (2012). Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1253, 94-104.

Mortier, L., Daeseleire, E., Delahaut, P. (2003). Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 483(1-2), 27-37.

Olejniak, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., Jedziniak, P. (2009). Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8141-8148.



Pereira, M. U., Spisso, B. F., do Couto Jacob, S., Monteiro, M. A., Ferreira, R. G., de Souza Carlos, B., da Nóbrega, A. W. (2016). Validation of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. *Food chemistry*, 196, 130-137.

Pietruk, K., Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. (2015). Determination of fifteen coccidiostats in feed at carry-over levels using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 112, 50-59.

Reglamento nº 574/2011 de la Comisión, de 16 de junio de 2011, por el que se modifica el Anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melanina y *Ambrosia* spp. y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonóstatos y por la que se consolidan sus Anexos I y II. *Diario Oficial de la Comunidad Europea*, L159; 17 de junio de 2011; 7–24.

Reglamento (UE) 2019/4 del Parlamento Europeo, del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, relativo a la fabricación, comercialización y uso de piensos medicamentosos, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L4; 7 de enero de 2019; 1-23

Rokka, M., Peltonen, K. (2006). Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method. *Food additives and contaminants*, 23(05), 470-478.

Shao, B., Wu, X., Zhang, J., Duan, H., Chu, X., Wu, Y. (2009). Development of a rapid LC–MS–MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. *Chromatographia*, 69(9-10), 1083-1088.

Valese, A. C., Molognoni, L., de Souza, N. C., de Sá Ploêncio, L. A., Costa, A. C. O., Barreto, F. y Daguer, H. (2017). Development, validation and different approaches for the measurement uncertainty of a multi-class veterinary drugs residues LC–MS method for feeds. *Journal of Chromatography B*, 1053, 48-59.

Vincent, U., Chedin, M., Yasar, S., von Holst, C. (2008). Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Part I. Application to targeted feed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4-5), 750-757.

Vudathala, D., Murphy, L. (2012). Rapid method for the simultaneous determination of six ionophores in feed by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 95(4), 1016-1022.

Wang, Y., Liu, L., Xiao, C., Chen, L., Yang, P., Liu, Q., Wang, J., Liu, X. (2016). Rapid determination of trace sulfonamides in milk by graphene oxide-based magnetic solid phase extraction coupled with HPLC–MS/MS. *Food Analytical Methods*, 9(9), 2521-2530.

## **CAPÍTULO 4**

### **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA CUANTIFICAR TETRACICLINAS EN PIENSOS**

#### **4.1. INTRODUCCIÓN**

El consumo de carne se incrementa de año en año y como consecuencia, aumenta la producción de animales de abasto (Thornton y col., 2010). Con el objeto de aumentar el rendimiento y reducir el coste, los animales se crían de manera intensiva en granjas de gran tamaño que requieren un mayor control de la salud de los animales, ya que las enfermedades pueden transmitirse de esta modo de un animal a otro con mayor facilidad, causando grandes pérdidas económicas al ganadero.

Por lo tanto, el uso de fármacos veterinarios en producción animal es importante para el control y el mantenimiento de la salud de los animales destinados a producción de alimentos. Estas sustancias no solamente se utilizan en tratamiento terapéutico, sino también como prevención. Como ya se menciona en el capítulo 1, Sección 1.1.2, se pueden administrar los fármacos a los animales de varias formas, tales como comprimidos, preparados en suspensión, emulsión, inyecciones, implantes y cremas. También, a través de los piensos se administran fármacos veterinarios. La dosis y el tipo de tratamiento dependerá de la enfermedad y de la especie animal. Dado que el mismo fabricante

puede producir piensos de diferentes especies animales, se hace necesario un exhaustivo control de la concentración de los fármacos en los piensos. Según Kools y col. (2008), la estimación de sustancias activas utilizadas en la producción de alimentos de origen animal llegó a ser de 6.051 Tm en la UE, (en base a datos recogidos entre 1999 y 2004). Los antibióticos fueron los fármacos utilizados con mayor frecuencia (5393 Tm) seguidos por los agentes antiparasitarios (194 Tm). El estudio también indicaba que dentro del grupo de los antibióticos, las tetraciclinas y los beta-lactámicos fueron los que se utilizaron en mayor cantidad.

No abundan los métodos analíticos en la literatura científica consultada para la cuantificación de antimicrobianos en piensos medicados (Samanidou y col., 2008; Van Holthoon y col., 2010; Pereira y col., 1973) ya que la mayoría de los métodos publicados describen técnicas analíticas para tetraciclinas en alimentos (Andersen y col., 2005; Karageorgou y col., 2014; Martins y col., 2014).

La administración de piensos medicados a los animales de abasto sólo puede ser llevada a cabo bajo prescripción y vigilancia veterinaria, dado que el control de la concentración correcta de antimicrobiano en el pienso es vital para evitar posteriores problemas de seguridad alimentaria. Durante la fabricación del pienso medicado, el fabricante debe garantizar la dosificación correcta de la sustancia farmacológica en el pienso, asegurando la homogeneidad del compuesto en todo el lote. En este sentido, hay que tener en cuenta distintas circunstancias, tales como las características constructivas de las instalaciones donde se fabrica el pienso, la complejidad de las materias primas que lo componen, el comportamiento de cada fármaco veterinario atendiendo a su composición química, etc.

En base al común uso de tetraciclinas en la producción de alimentos, la escasez de métodos disponibles para este análisis en piensos de animales de abasto y la demanda del sector debido a los problemas de elevada contaminación cruzada, el objetivo de este trabajo de investigación es presentar un método HPLC-MS/MS fiable

y reproducible para el análisis de tetraciclinas en muestras de piensos medicados o con un alto contenido de tetraciclinas.

## **4.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo**

Los reactivos químicos y cromatográficos utilizados fueron específicos para HPLC o de grado analítico. Tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y democociclina, con una pureza superior a 98%, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, EEUU). La democociclina se utilizó como estándar interno (IS). El  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , el ácido cítrico anhidro, la sal disódica de EDTA (ácido etilén diaminotetraacético), el TCA (ácido tricloroacético) y el ácido fórmico (pureza >99% para análisis) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (San Luis, EEUU). Los solventes orgánicos (metanol, acetato de etilo y ácido clorhídrico), se adquirieron en Scharlau Chemie (Barcelona, España). El agua desmineralizada (resistividad 18 MU cm) se obtuvo en el laboratorio con un sistema de agua Milli-Q® (Millipore, Bedford, EEUU).

Las soluciones patrón de tetraciclinas se prepararon disolviendo 20 mg ( $\pm 0,1$  mg) de cada analito en matraces de 20 ml de metanol y se almacenaron a  $-18^\circ\text{C}$  hasta su uso, siendo viables durante un mes. Estas soluciones se mezclaron y diluyeron con metanol con el fin de obtener una solución de concentración intermedia de las cuatro tetraciclinas a 50  $\mu\text{g/ml}$ , pudiéndose almacenar a  $-18^\circ\text{C}$  durante un máximo de una semana.

Se prepararon también solución madre, solución intermedia y solución de trabajo del IS y se almacenaron bajo las mismas condiciones que las tetraciclinas.

La solución de extracción se preparó mezclando 20 ml de ácido clorhídrico fumárico al 37% en 980 ml de metanol.

#### **4.2.2. Equipamiento**

Se utilizó un molinillo Moulinex Groupe SEB (Ecully, Francia) para triturar las muestras de pienso. Después, se utilizó un agitador orbital modelo New Brunswick Scientific G25 (New Jersey, EEUU). Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm en una centrífuga modelo 5415D de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y se utilizaron filtros de centrífuga Ultrafree-MC de Millipore (Bedford, EEUU).

El sistema HPLC-MS/MS consiste en un equipo de HPLC de Agilent Technologies (Warldbornm, Alemania) acoplado a un espectrofotómetro de MS QTrap 2000<sup>TM</sup> de Applied Biosystems/DMS-Sciex (Toronto, Canadá). El software Analyst 1.4.1 de Applied Biosystems (Toronto, Canadá) se empleó para adquirir los datos y controlar el sistema.

El análisis de las tetraciclinas por HPLC-MS/MS se llevó a cabo utilizando una columna de HPLC Sunfire C18 (150 x 2,1 mm; 5,0 µm de tamaño de partícula) de Waters (Milford, EEUU).

Los resultados de estos análisis se compararon con los obtenidos analizando las muestras mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. El sistema HPLC-Fluorescencia consistió en un HPLC Alliance 2695 y detector de Fluorescencia, modelo 2475; ambos de Waters (Milford, EEUU). Se utilizó una columna de HPLC modelo LiChroCART Purospher<sup>®</sup> STAR RP-8 (4.6 x 150 mm, 5 m m).

#### **4.2.3. Condiciones del HPLC-MS/MS**

La separación de los analitos se realizó inyectando 25 µl de extracto de muestra y aplicando una mezcla del componente A (0,04% ácido fórmico en agua) y B (0,04% ácido fórmico en metanol) sobre un gradiente tal y como se detalla a continuación: 0 - 8 min 0% B; 8 - 9 min 45% B; 9 - 14 min 61% B; 14 - 15 min 0% B; 15 - 18 min 0%

B. La temperatura del horno de la columna se programó a 35 °C y durante todo el gradiente se aplicó un flujo a la fase móvil de 0.25 ml/min.

Las tetraciclinas separadas fueron dirigidas a la fuente de electrospray del MS, que operó en el modo positivo y bajo las siguientes condiciones: voltaje del capilar 3 kV; temperatura de la fuente 120°C; temperatura de desolvatación 350 °C; flujo del gas en el cono 49 l/h y flujo del gas de solvatación 650 l/h. Los analitos se identificaron con sus Rt y con dos MRM seleccionadas.

#### **4.2.4. Extracción de muestras para análisis mediante HPLC-MS/MS**

El protocolo de preparación de muestras se basó en un trabajo previo (AOAC, 2009). Se molieron y homogeneizaron 200 g de pienso en un molinillo y 2 g de este polvo se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml. Para extraer las tetraciclinas del pienso, se añadieron 20 ml de la solución de extracción, el tubo se cerró y se homogeneizó su contenido durante 20 min a 200 rpm en un agitador. La mezcla se centrifugó a 2500 rpm y una alícuota del extracto se filtró a través de un filtro de centrifuga Ultrafree-MC de Millipore.

El extracto filtrado se diluyó diez veces con una mezcla de los componentes de la fase móvil (90:10; Fase A:Fase B) y se transfirió a un vial HPLC que contenía un insert de 0,3 ml. Este vial se almacenó a -18°C hasta el análisis de la muestra mediante HPLC-MS/MS, que tuvo lugar en las 24 h siguientes. La Figura 4.1 ilustra este protocolo.

Para la cuantificación, se utilizaron muestras de pienso blanco (pienso sin tetraciclinas) a las cuales se adicionaron diferentes alícuotas de solución patrón con la mezcla de las cuatro tetraciclinas para obtener las siguientes concentraciones: 50, 100, 150, 200 y 250 mg/kg. Después de la adición del patrón y previamente a la extracción, las muestras se colocaron en un agitador orbital a 200 rpm

durante 10 min. Además de estas muestras de pienso, también se procesaron dos muestras que contenían sólo los reactivos (sin pienso). A una de ellas se le añadieron las tetraciclinas a una concentración de 100 mg/kg (reactivos fortificados) y a la otra no se le añadieron los analitos (blanco de reactivos) conteniendo simplemente los reactivos de extracción.

Para el desarrollo y puesta a punto del método se emplearon muestras de pienso blancas, es decir, carentes de cualquier resto de tetraciclinas, a las cuales se les adicionaron diferentes concentraciones de estas sustancias en un rango entre 1 y 300 mg/kg.



Figura 4.1. Protocolo de extracción de tetraciclinas en piensos medicados para su análisis por HPLC-MS/MS

#### 4.2.5. Validación del método HPLC-MS/MS

La Decisión de la Comisión 2002/657/CE establece el criterio y los resultados de interpretación para los métodos de análisis de



muestras de alimentos y piensos de animales de abasto. A pesar de que el método que se describe ha sido desarrollado para el análisis de muestras de pienso medicadas, donde la adición de estas sustancias al pienso se realiza de manera intencionada, se siguió el criterio incluido en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE para la identificación y cuantificación de clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina. Sin embargo, como no existen niveles máximos residuales para estas sustancias, la capacidad de detección ( $CC\beta$ ) y límite de decisión ( $CC\alpha$ ) del método no fueron investigados. Por otro lado, la veracidad/recuperación, precisión, especificidad y aplicabilidad/robustez se investigaron en dos laboratorios dedicados al control de residuos de fármacos veterinarios en muestras de alimentos.

Para la validación del método se emplearon tres lotes de muestras adicionadas con tetraciclinas. Cada lote fue analizado en un día distinto y consistió en 21 muestras fortificadas con tetraciclinas a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 500 mg/kg. Se emplearon seis réplicas para niveles de 50, 100 y 150 mg/kg y sólo una muestra para los niveles de 0, 20 y 500 mg/kg.

La Figura 4.1 muestra los cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra de pienso blanco. La Figura 4.2 muestra los cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra fortificada con 50 mg/kg de cada una de ellas.

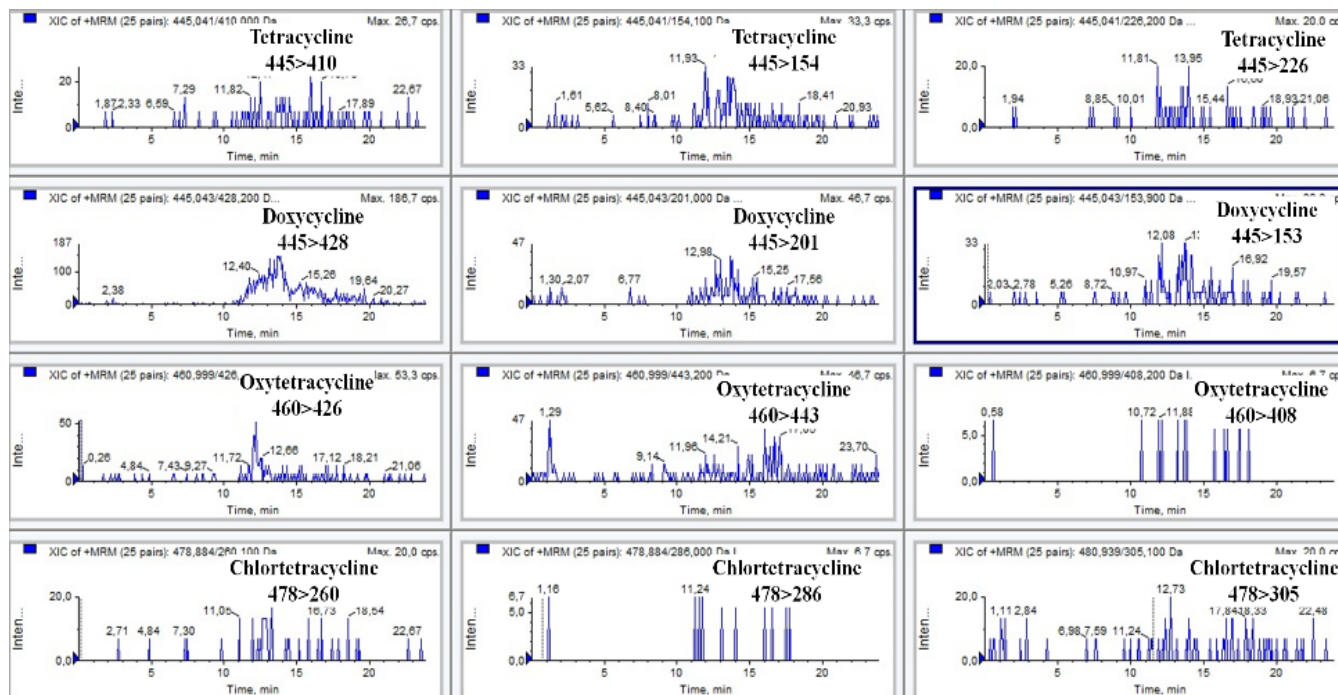


Figura 4.2. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra blanco.

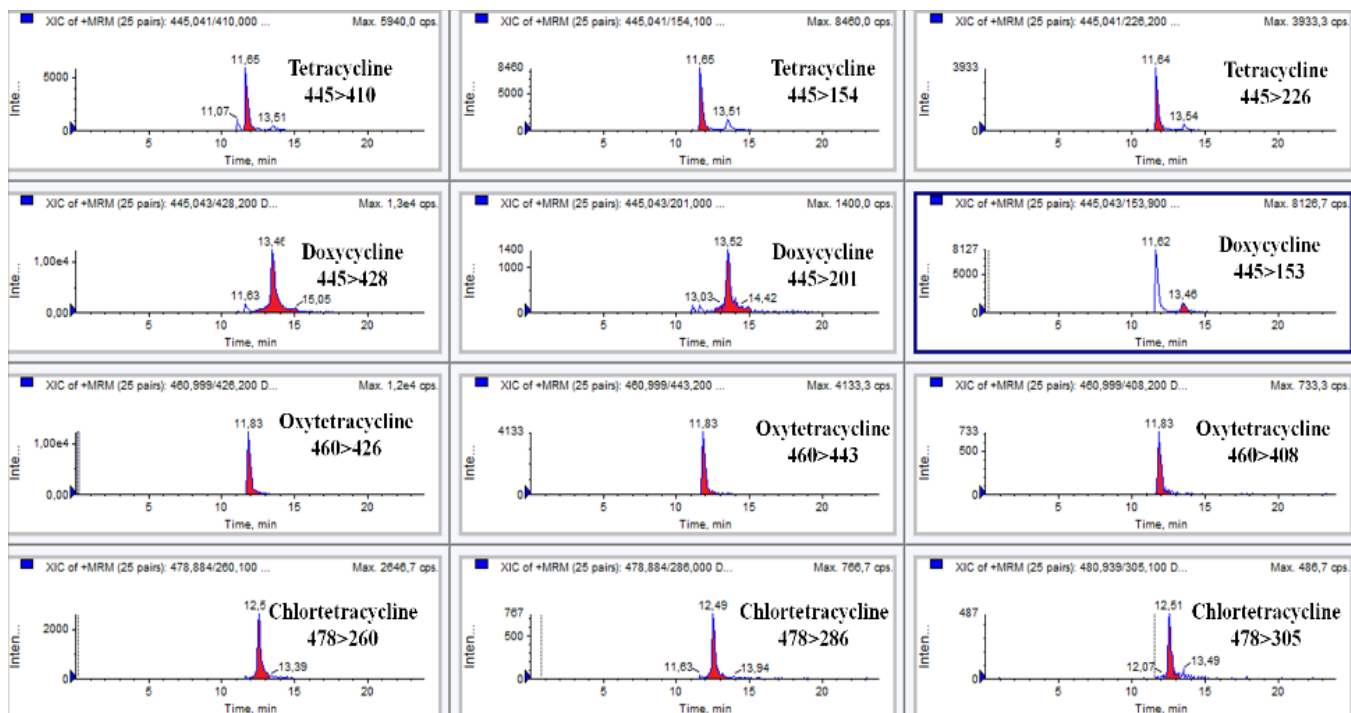


Figura 4.3. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra fortificada a 50 mg/kg

#### **4.2.6. HPLC acoplado a un detector de fluorescencia**

El método de HPLC acoplado a un detector de fluorescencia se encontraba dentro del alcance de la acreditación en otro laboratorio y se empleó para comparar los resultados obtenidos con el método de HPLC-MS/MS. Para el método basado en fluorescencia, se inyectó un volumen de 10 µl de extracto en una columna de HPLC. La fase móvil consistió en metanol (fase móvil A) y cloruro de calcio y tampón EDTA a pH = 6,5 (fase móvil B) con un flujo de 0,6 ml/min. El gradiente se desarrolló como se indica a continuación: 0 min, 30 % A; 8 min, 55 % A; 11 min, 60 % A; 12 min 30 % A; 17 min 30 % A. El detector trabajó a una longitud de onda de excitación de 390 nm y con una longitud de onda de emisión de 512 nm.

El protocolo de extracción empleado para la detección por fluorescencia tiene bastantes similitudes con el descrito para la técnica HPLC-MS/MS. Se llevó a cabo con 20 ml de metanol acidificado y después de agitar durante 20 min, el extracto se filtró y en este caso, se transfirió a un matraz de 25 ml. El matraz se enrasó con más metanol acidificado hasta 25 ml y tal y como se menciona en la sección de preparación de muestras, el extracto se filtró previamente al análisis por HPLC-Fluorescencia.

#### **4.2.7. Muestras**

Fue posible aplicar el método a muestras de distinta procedencia, tanto de fábricas de pienso, como de entidades certificadoras organizadoras de análisis interlaboratoriales: AAFCO e INTER2000.

Se analizaron por triplicado 4 muestras de pienso medicado que fueron aportadas por fábricas de piensos y que contenían, respectivamente: 70 mg/kg de clortetraciclina, 50 mg/kg de doxiciclina, 50 mg/kg de oxitetraciclina y 200 mg/kg de tetraciclina. Las muestras analizadas de AAFCO y de INTER2000 fueron un total de 6 y contenían, respectivamente, 80 mg/kg de clortetraciclina, 29

mg/kg de doxiciclina, 400 mg/kg de oxitetraciclina, 60 mg/kg de clortetraciclina, 55 mg/kg de clortetraciclina y 28 mg/kg de oxitetraciclina. Estas últimas muestras también se analizaron por triplicado.

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS**

Para optimizar cada tetraciclina, se prepararon soluciones patrón de los compuestos individuales a 1 µg/ml en metanol acidificado al 0,1% de ácido fórmico. De esta forma, se seleccionó el ion precursor y los iones productos para cada una de las tetraciclinas y el IS. El voltaje del cono y la energía de colisión se optimizaron para obtener la señal más intensa de cada ion precursor y productos.

La Tabla 4.1 muestra los iones precursores y productos seleccionados para la identificación de las tetraciclinas, así como el voltaje del cono y la energía de colisión empleados para cada una de las transiciones. Se emplearon las transiciones entre el ion precursor y el ion producto 1 y 2 para la confirmación de los analitos y la transición entre el ion precursor y el ion producto 1 para la cuantificación.

**Tabla 4.1. Rt (min), iones precursor y producto ((m/z)<sup>+</sup>), CV (V) y EC (V) empleados para la identificación de las tetraciclinas**

| TETRACICLINA     | Rt    | (m/z) <sup>+</sup> | CV | EC |
|------------------|-------|--------------------|----|----|
| Tetraciclina     | 12,63 | 445>410*           | 30 | 29 |
| Tetraciclina     |       | 445>154            | 30 | 27 |
| Doxiciclina      | 13,64 | 445>428*           | 30 | 20 |
| Doxiciclina      |       | 445>125            | 30 | 27 |
| Clortetraciclina | 11,84 | 479>462*           | 30 | 23 |
| Clortetraciclina |       | 479>444            | 30 | 23 |
| Oxitetraciclina  | 12,61 | 461>443*           | 30 | 20 |
| Oxitetraciclina  |       | 461>426            | 30 | 20 |
| Democociclina    | 12,00 | 465>448*           | 30 | 17 |

\*Transición utilizada para la cuantificación del analito.

La selección de la columna de HPLC y el método de cromatografía se basó en un trabajo descrito previamente por Xu y col. (2008); no obstante, el gradiente fue modificado para obtener mejor resolución de los picos cromatográficos.

#### **4.3.2. Optimización del protocolo de extracción**

El hecho de que las concentraciones de tetraciclinas en piensos medicados estén en rangos de mg/kg, simplifica su extracción para el análisis mediante HPLC-MS/MS. Esta técnica ha sido seleccionada porque está reconocida como técnica confirmatoria por la Decisión 2002/657/CE.

El análisis de estos antibióticos en piensos medicados ha sido descrito previamente, empleando técnicas tales como espectrofluorometría sincrónica (Fernández-González y col., 2002) y HPLC-UV (Wang y col., 2008; Touraki y col., 1995). Existen datos publicados sobre métodos basados en MS que han sido utilizados para

el análisis de las tetraciclinas en pienso a niveles traza (Kaklamanos y col., 2013; Boscher y col., 2010).

Antes de establecer el protocolo de extracción final, se probaron protocolos de extracción descritos para el análisis de tetraciclinas en matrices alimentarias y piensos. Considerando que las tetraciclinas forman quelatos con diferentes cationes, el uso de EDTA es una práctica común y ha sido publicada para análisis de muestras tales como riñón, músculo de carne y músculo de pescado (Martins y col., 2014; Fernández-González y col., 2002; Boscher y col., 2010; Freitas y col., 2014). El tampón McIlvaine, un tampón citrato/fosfato, se utiliza también comúnmente para el análisis de tetraciclinas con o sin EDTA (Karageorgou y col., 2014; Boscher y col., 2010; Yang y col., 2010). Estos dos agentes se utilizaron independientemente, combinados y con la adición de ácido tricloroacético para la extracción de tetraciclinas en piensos. Después de esta primera extracción, el sobrenadante se mezcló con diferentes cantidades de acetato de etilo y la fase orgánica se evaporó a sequedad. El extracto seco se reconstituyó con la fase móvil 90A:10B para su análisis posterior. Sin embargo, en ninguna de las combinaciones probadas se obtuvo una buena recuperación; es decir, no se cuantificaron las concentraciones esperadas, según los datos de dosificación aportados por el fabricante de pienso.

Las tetraciclinas se disuelven bien en alcohol, pero el metanol no se usa habitualmente para su extracción, porque la limpieza del extracto es difícil. Se probó un método publicado por Phenomenex para muestras de miel que emplea metanol acidificado, esto es, 0,833 ml de HCl 1M en 200 ml de metanol, seguido de la purificación del extracto con cartucho SPE, pero tampoco dio lugar a resultados satisfactorios.

Los mejores resultados se obtuvieron con el protocolo de extracción más sencillo, que empleó metanol acidificado; este protocolo fue descrito anteriormente por AOAC para la extracción de oxitetraciclina en muestras de pienso (AOAC, 2008). Se empleó metanol acidificado (ácido clorhídrico fumárico en metanol, al 2%) a

un nivel más alto que las condiciones recomendadas por el método probado anteriormente de Phenomenex y se diluyó el extracto con la fase móvil para su análisis por HPLC-MS/MS.

Se observó que un factor importante en la extracción de las tetraciclinas en muestras de pienso fue el tiempo de agitación. Las mejores recuperaciones fueron obtenidas para concentraciones entre 50 y 500 mg/kg mediante agitación de las muestras durante 20 min en un agitador orbital. Tiempos de agitación más cortos redujeron considerablemente las recuperaciones, pero tiempos de agitación más altos no incrementaron este parámetro.

#### **4.3.3. Validación del método**

La validación se llevó a cabo según los requerimientos de la Decisión 2002/657/CE. La Tabla 4.2 muestra los resultados obtenidos durante la validación para el método de HPLC-MS/MS y para el método HPLC-Fluorescencia.



**Tabla 4.2. Recuperaciones (%), RSD<sub>r</sub> y RSD<sub>R</sub> obtenidas con la validación del método HPLC-MSMS y a 50 mg/kg con el método de HPLC-Fluorescencia**

| HPLC-MS/MS              |           |              |                  |                  | HPLC-Fluorescencia |              |                  |                  |
|-------------------------|-----------|--------------|------------------|------------------|--------------------|--------------|------------------|------------------|
| mg/kg                   | Exactitud | Recuperación | RSD <sub>r</sub> | RSD <sub>R</sub> | Exactitud          | Recuperación | RSD <sub>r</sub> | RSD <sub>R</sub> |
| <b>CLORTETRACICLINA</b> |           |              |                  |                  |                    |              |                  |                  |
| 50                      | 103       | 98           | 8                | 10               | 98                 | 62           | 2,4              | 7,3              |
| 100                     | 90        |              | 7                | 8                |                    |              |                  |                  |
| 150                     | 94        |              | 7                | 8                |                    |              |                  |                  |
| <b>OXITETRACICLINA</b>  |           |              |                  |                  |                    |              |                  |                  |
| 50                      | 93        | 95           | 9                | 14               | 101                | 60           | 3,7              | 3,9              |
| 100                     | 102       |              | 8                | 8                |                    |              |                  |                  |
| 150                     | 105       |              | 7                | 9                |                    |              |                  |                  |
| <b>TETRACICLINA</b>     |           |              |                  |                  |                    |              |                  |                  |
| 50                      | 104       | 98           | 8                | 13               | 108                | 50           | 3,4              | 6,7              |
| 100                     | 104       |              | 11               | 13               |                    |              |                  |                  |
| 150                     | 109       |              | 4                | 7                |                    |              |                  |                  |
| <b>DOXICICLINA</b>      |           |              |                  |                  |                    |              |                  |                  |
| 50                      | 87        | 92           | 15               | 16               | 108                | 58           | 1,9              | 6,9              |
| 100                     | 94        |              | 10               | 12               |                    |              |                  |                  |
| 150                     | 84        |              | 11               | 12               |                    |              |                  |                  |

Se analizaron 20 muestras de pienso para determinar la selectividad/especificidad. La adecuada cuantificación de las tetraciclinas y la ausencia de picos cromatográficos interferentes en los tiempos de retención de las tetraciclinas demostró la selectividad/especificidad del método.

Dado que no existe material de referencia para tetraciclinas en pienso, la exactitud del método se calculó en términos de recuperación. La precisión, definida como el grado de similitud entre análisis independientes obtenidos bajo unas condiciones previamente establecidas, se calculó bajo condiciones de repetibilidad y

reproducibilidad y se establecieron la  $RSD_r$  y  $RSD_R$  del método. La recuperación y la precisión del método se calcularon empleando muestras de pienso adicionadas con tetraciclinas a 50, 100 y 150 mg/kg, con seis réplicas para cada una de las concentraciones. La repetibilidad del método se calculó analizando estas muestras el mismo día varias veces y la reproducibilidad se calculó repitiendo el análisis de estas muestras en tres días diferentes.

La tetraciclina fue la sustancia con menor desviación de la recuperación entre concentraciones y la clortetraciclina la sustancia con la desviación más alta. Aunque las recuperaciones de la tetraciclina estaban entre 84% y 109%, estos valores se consideraron aceptables y dentro de los límites establecidos por la Decisión 2002/657/CE. Según los criterios definidos en esta legislación, la  $RSD_R$  máxima aceptada para concentraciones de 100 mg/kg es 23% y la  $RSD_r$  debería estar entre 11% y 16%. Los valores más bajos de repetibilidad se obtuvieron para la clortetraciclina, con una  $RSD_r$  por debajo de 9%, mientras que la doxiciclina tuvo la mayor  $RSD_r$  (15%). La  $RSD_R$  se encontraba entre 7% para la tetraciclina y 16% para la doxiciclina. Por lo tanto, podría decirse que  $RSD_r$  y  $RSD_R$  están dentro de los límites establecidos por la Decisión 2002/657/CE.

El LDD y el LDC del método se calcularon y se verificaron con muestras de pienso fortificadas con tetraciclinas a diferentes concentraciones. Se estableció un ratio de S/N superior a 3 para el LDD y superior a 10 para el LDC. El LDD y el LDC para este método deberían estar entre 1 y 10 mg/kg. De todas formas, considerando el hecho de que el extracto se diluyó 10 veces antes del análisis, el LDD y el LDC deberían ser al menos 10 veces más bajos. Por otro lado, el método se optimizó para la extracción de tetraciclinas a niveles de piensos medicados (mg/kg), por lo que el rango de LDD y el LDC de  $\mu\text{g/kg}$  puede interesar para otros tipos de muestras de pienso pero no para medicados. Considerando los resultados obtenidos durante la validación, el tamaño de pico cromatográfico, la repetibilidad, la reproducibilidad y la exactitud, se ha establecido un LDD y un LDC de 5 mg/kg para todas las tetraciclinas. Para verificar esto, las muestras de pienso se fortificaron con tetraciclinas a 1, 4, 10 y 20

mg/kg; se extrajeron y analizaron estos extractos sin diluir, inyectándose después de filtrar. Se calculó la relación S/N de cada concentración para cada tetraciclina individual. Se obtuvo una relación S/N superior a 10 para cada tetraciclina a 5 mg/kg.

#### **4.3.4. Comparación entre los métodos HPLC-MS/MS y HPLC-Fluorescencia**

Los resultados obtenidos con la validación del método de HPLC-MS/MS se compararon con los obtenidos con un método de HPLC-Fluorescencia (Tabla 4.2). La principal diferencia entre los dos métodos es la forma de detectar los compuestos, porque el protocolo de extracción es muy semejante. Los datos de exactitud fueron muy similares en ambos métodos: a 50 mg/kg, la exactitud para el método MS/MS se encontraba entre 87% (doxiciclina) hasta 104% (tetraciclina) y para el método de fluorescencia fue desde 98% (clortetraciclina) hasta 108% (tetraciclina).

La precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad obtenida para el método HPLC-Fluorescencia fue, en general, tres veces más baja que la obtenida para el método de HPLC-MS/MS (Tabla 4.2). Estos resultados pueden deberse probablemente a factores tales como la dilución; el método HPLC-MS/MS requiere de una dilución previa del extracto para su análisis. Adicionalmente, mientras la técnica HPLC-Fluorescencia es un análisis directo, la detección MS precisa una fase gaseosa de los compuestos, que se obtuvo mediante ionización en electrospray, lo que implica más variabilidad entre muestras.

#### **4.3.5. Resultados de las muestras analizadas**

Las muestras de pienso aportadas por el fabricante con concentraciones conocidas de cada tetraciclina fueron analizadas por

el método HPLC-MS/MS desarrollado y por el método HPLC-fluorescencia, para su comparación. Se obtuvieron resultados satisfactorios por ambos métodos, ya que se midieron concentraciones similares a las declaradas (se dio una exactitud en ambos laboratorios entre 89% y 105%). Además, tanto el laboratorio con el equipo HPLC-MS/MS como el laboratorio con el equipo HPLC-fluorescencia tomaron parte en diferentes ensayos interlaboratoriales; la exactitud se mantuvo entre 85% y 102% para concentraciones entre 20 y 300 mg/kg y valores de z-score entre 1,77 y 1,5.

#### 4.4. CONCLUSIONES

El uso de fármacos veterinarios en la producción animal es una práctica común. Los fármacos se usan con fines terapéuticos y profilácticos. Una forma sencilla de administrar los antimicrobianos a los animales es a través del alimento. A pesar de ello, existen pocos métodos para el análisis preciso de estas sustancias añadidas en cantidades terapéuticas y de manera homogénea en muestras de pienso.

En este capítulo se ha descrito un método HPLC-MS/MS para el análisis simultáneo de cuatro tetraciclinas en muestras de pienso; los resultados se compararon con los de un método de HPLC-Fluorescencia acreditado que empleaba un protocolo de extracción similar obteniéndose resultados similares con los dos métodos.

#### 4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera-Luiz, M. M., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Vidal, J. L. M., Frenich, A. G. (2013). Wide-scope analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(20), 6543-6553.

Andersen, W. C., Roybal, J. E., Gonzales, S. A., Turnipseed, S. B., Pfenning, A. P., Kuck, L. R. (2005). Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529(1-2), 145-150.

AOAC Official Methods (2008). Oxytetracycline/oxytetracycline hydrochloride in animal feed, fish feed and animal remedies. *Official Methods of Analysis of AOAC international*, 18, 82-87

Boscher, A., Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., Bohn, T. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6394-6404.

Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002 Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 221; 17 de agosto de 2002; 8-36.

Fernández-González, R., García-Falcón, M. S., Simal-Gándara, J. (2002). Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 455(1), 143-148.

Freitas, A., Barbosa, J., Ramos, F. (2014). Multi-residue and multi-class method for the determination of antibiotics in bovine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Meat science*, 98(1), 58-64.

Kaklamanos, G., Vincent, U., von Holst, C. (2013). Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1293, 60-74.

Karageorgou, E., Armeni, M., Moschou, I., Samanidou, V. (2014). Ultrasound-assisted dispersive extraction for the high pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines residues in milk with diode array detection. *Food chemistry*, 150, 328-334.

Kools, S. A., Boxall, A. B., Moltmann, J. F., Bryning, G., Koschorreck, J., Knacker, T. (2008). A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4(4), 399-408.

Li, W., Herrman, T. J., Dai, S. Y. (2011). Determination of aflatoxins in animal feeds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with isotope dilution. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(9), 1222-1230.

Martins, M. T., Melo, J., Barreto, F., Hoff, R. B., Jank, L., Bittencourt, M. S., Arsand, J. B., Schapoval, E. E. S. (2014). A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 129, 374-383.

Nebot, C., Guarddon, M., Seco, F., Iglesias, A., Miranda, J. M., Franco, C. M., Cepeda, A. (2014). Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS. *Food Control*, 46, 495-501.

Pereira, S. M., Jones, S., Jesudian, G., Begum, A. (1973). Feeding trials with lysine-and threonine-fortified rice. *British journal of nutrition*, 30(2), 241-250.

Samanidou, V. F., Evaggelopoulou, E. N. (2008). Chromatographic analysis of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Journal of separation science*, 31(11), 2091-2112.

Senyuva, H. Z., Gilbert, J., Türköz, G., Leeman, D., Donnelly, C. (2012). Analysis of Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2, and HT-2 Toxins in Animal Feed by LC/MS/MS. A Critical Comparison of

Immunoaffinity Column Cleanup with No Cleanup. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1701-1708.

Sharma, V., Wadhwa, B. K., Stan, H. J. (2005). Multiresidue analysis of pesticides in animal feed concentrate. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 74(2), 342-349.

Thornton, P. K. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853-2867.

Touraki, M., Rigas, P., Pergandas, P., Kastritsis, C. (1995). Determination of oxytetracycline in the live fish feed *Artemia* using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 663(1), 167-171.

Van Holthoon, F., Mulder, P. P., van Bennekom, E. O., Heskamp, H., Zuidema, T. (2010). Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(8), 3027-3040.

Varzakas, T., Demopoulos, V., Manolopoulou, E. (2011). Detection of aflatoxins, trichothecenes and zearalenone in food and animal feed by reversed phase HPLC and SPE. In *I International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits*, 963, 119-128.

Vinas, P., Campillo, N., Carrasco, L., Hernandez-Cordoba, M. (2007). Analysis of nitrofurantoin residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection. *Chromatographia*, 65(1-2), 85-89.

Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y., Lu, X. (2008). Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high

performance liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, 619(1), 54-58.

Xu, J. Z., Ding, T., Wu, B., Yang, W. Q., Zhang, X. Y., Liu, Y., Jiang, Y. (2008). Analysis of tetracycline residues in royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 868(1-2), 42-48.

Yang, J. F., Ying, G. G., Zhao, J. L., Tao, R., Su, H. C., Chen, F. (2010). Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3424-3432.





## **CAPÍTULO 5**

# **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE TETRACICLINAS EN PIENSOS**

### **5.1. INTRODUCCIÓN**

La demanda de alimentos de origen animal se incrementa cada año y para satisfacerla, la producción de ganado en la UE en 2011 fue de aproximadamente 10 millones de cabezas de cabras, 80 millones de cabezas de ovejas, 80 millones de cabezas de vacas y 150 millones de cabezas de cerdos (Eurostat, 2015). Tal y como se ha visto en los capítulos anteriores, el uso de medicamentos añadidos a los piensos viene justificado por la necesidad de tratar a los animales de abasto cuando son diagnosticados de una enfermedad, especialmente, cuando se trata de producción de animales en intensivo. En este caso, los piensos concentrados suponen una parte importante de la alimentación, pudiendo contener diversas materias primas (avena, trigo, cebada, centeno, algodón, etc.) y aditivos.

Los antibióticos y agentes antiparasitarios son los grupos de fármacos más comúnmente administrados. Dentro del grupo de los antibióticos, los más frecuentemente utilizados son las sulfamidas, tetraciclinas y beta-lactámicos y los coccidiostáticos y las ivermectinas, dentro del grupo de los agentes antiparasitarios.

Coccidiostáticos e histomonostatos son un grupo de agentes antiparasitarios que han demostrado ser persistentes durante la

fabricación del pienso dando lugar a la transferencia inevitable de trazas de estos compuestos a otros piensos.

De igual manera, la contaminación cruzada entre piensos medicados y no medicados (piensos no destinatarios) puede ocurrir con cualquier tipo de fármaco añadido al pienso, no sólo con los coccidiostáticos, particularmente cuando el proceso de limpieza entre lotes de fabricación no es eficiente. Un estudio dirigido por Stolker y col. (2013) en los Países Bajos confirmó que los lotes de piensos no destinatarios estaban contaminados con residuos de antibióticos tales como tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas. Según este estudio, de 140 muestras analizadas, el 87% testado fueron positivas para antibióticos con una concentración de 0,1-154 mg/kg.

El hecho de que los antibióticos puedan presentarse como contaminantes en pienso sin el conocimiento de los granjeros, implica que los residuos de antibióticos podrían pasar a los productos de origen animal a través de la cadena alimentaria (carne, huevos, leche y pescado) y permanecer en ellos, además de favorecer el desarrollo de resistencias bacterianas (Mevius y col., 1999).

Debido a las consecuencias que pueden tener los residuos de estos fármacos para la seguridad alimentaria, las autoridades implantaron una vigilancia regular para la presencia de fármacos veterinarios en alimentos de origen animal (huevos, leche, músculo e hígado). También se han implementado controles en el agua y alimento consumidos por los animales, pero los análisis llevados a cabo sólo evaluaban la presencia de sustancias tales como pesticidas (Aguilera-Luiz y col., 2013; Sharma y col., 2005); nitrofuranos (Viñas y col., 2009) y micotoxinas (Senyuva y col., 2012; Varzakas y col., 2012; Li y col., 2011).

Los LMR para clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina y sus tres epímeros han sido incorporados para varios alimentos de origen animal, incluidos huevos, carne y leche (Reglamento 37/2010).

Con la publicación del Reglamento 2019/4 relativo a la fabricación, comercialización y uso de piensos medicamentosos, queda perfilado para un futuro próximo, el control de residuos de un extenso grupo de antimicrobianos en los piensos, de los que está previsto establecer un LM de residuos. Este grupo incluye entre otros antimicrobianos, clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina, que se usan con frecuencia en la producción de alimentos de origen animal. Dado que hasta el momento no se han establecido en muestras de pienso unos LM para estas sustancias y a la espera de lo dispuesto por el Reglamento 2019/4 que establece un plazo hasta el 28 de enero de 2023, cabría esperar su completa ausencia en los piensos suministrados al ganado.

Los métodos basados en la detección por HPLC-MS/MS se consideran métodos confirmatorios porque aportan una información total o complementaria, analizando sustancias que son inequívocamente identificadas y cuantificadas, al nivel de interés, de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE. Así pues, se recomienda el uso de métodos confirmatorios para detectar la presencia de residuos de antibióticos en piensos no medicados. Pocos métodos puede encontrarse en la literatura científica con estas características. Van Poucke y col. (2003) publicaron un método para el análisis de bacitracina de zinc, espiramicina, tylosina y virginamicina con límites de cuantificación por debajo de 500 µg/kg. Boscher y col. publicaron en 2018 un método multiresiduo para el análisis de 33 analitos de 14 grupos de antibióticos, incluyendo tetraciclinas, quinolonas, penicilinas, coccidiostáticos ionóforos, macrólidos y sulfonamidas; con límites de cuantificación de 3,8-65 µg/kg. Posteriormente, un método publicado por Stolker y col. en 2013 demostró poder medir de manera fiable tetraciclinas, macrólidos, sulfonamidas y penicilinas.

Las concentraciones de tetraciclinas en piensos medicados son variables y dependen del tipo de animal, con dosis que oscilan entre 25 y 700 mg/kg, aproximadamente. Así pues, es lógico esperar que ocurra una transferencia inevitable de estos compuestos a los lotes de piensos fabricados inmediatamente después de los piensos medicados. Stolker y col. publicaron en 2013 que el 100% de las muestras del

primer lote de pienso producido después de la fabricación de un pienso medicado estaban contaminadas con tetraciclinas, a concentraciones de 0,5 hasta 154 mg/kg. Basados en estos resultados, la contaminación por transferencia inevitables también se puede esperar para las otras dos tetraciclinas usadas comúnmente (clortetraciclina y tetraciclina), ya que tienen propiedades químicas similares (Oka y col., 2000; Anderson y col., 2005).

En base al uso común de tetraciclinas en la producción de alimentos de origen animal y la ausencia de métodos confirmatorios para determinar la presencia de las cuatro tetraciclinas en piensos no medicados, el objeto de este trabajo es presentar un método HPLC-MS/MS para el análisis de tetraciclinas en muestras de pienso no destinatario a niveles de  $\mu\text{g/kg}$ .

## **5.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo**

El  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , el ácido cítrico anhidro, la sal disódica de EDTA dihidratada, el ácido tricloroacético (TCA) y el ácido fórmico (pureza >99% para análisis) se adquirieron en Sigma-Aldrich (San Luis, EEUU). Tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina y oxitetraciclina (pureza >98%) y democlociclina, usada como IS se obtuvieron también de Sigma-Aldrich.

Los solventes orgánicos, metanol y acetato de etilo, HPLC o grado analítico, se adquirieron en Scharlau (Barcelona, Spain) y el agua desmineralizada (resistividad 18 MU cm) se obtuvo en el laboratorio con un sistema de agua Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

La fase móvil A consistió en agua Milli-Q® acidificada al 0,04% con ácido fórmico y la fase móvil B consistió en metanol, acidificado al 0,1% con ácido fórmico. Para preparar la solución stock individual de tetraciclina,  $20 \pm 0,1$  mg de tetraciclina se disolvieron en 20 ml de

metanol y se almacenaron a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La solución intermedia, una mezcla de tetraciclinas, se preparó diluyendo la solución patrón de cada tetraciclina a una concentración final de  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  y almacenada a  $-18^{\circ}\text{C}$ , con una durabilidad de un mes. Se preparó en fresco una solución de trabajo mezcla de tetraciclinas cada día diluyendo la solución patrón intermedia hasta una concentración final de  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ . A partir de la solución patrón del IS (20 mg en 20 ml de metanol) se prepararon las soluciones intermedia y de trabajo ( $1\text{ mg/ml}$ ).

El tampón McIlvaine se preparó con 10.8 g de ácido cítrico, 10.93 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 33.62 g de sal disódica de EDTA dihidratada ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$ ). Cada reactivo se diluyó primero individualmente en unos 100 ml de agua. La solución de EDTA se calentó hasta su completa disolución, siempre a temperatura inferior a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez que los tres reactivos se disolvieron completamente, se ajustó el pH a 4 y se llevó el volumen total a 1 l.

### 5.2.2. Equipamiento

Se utilizaron los siguientes equipos: molinillo Minimoka GR020 (Lleida, España), agitador orbital G25 de New Brunswick Scientific (Nueva Jersey, EEUU), centrífuga modelo 5415D (Eppendorf, Hamburgo, Germany), turboevaporador modelo Turbo Vap II de Zymark (Hopkinton, MA, EEUU) vórtex, filtros de centrífuga (Millipore, MA, EEUU)

El HPLC-MS/MS consistió en un equipo HPLC Alliance 2795 y un MS Quattro Premier XE triple cuadrupolo (Waters, Manchester, Reino Unido), controlado mediante software Masslynx 4.1 (Waters, Manchester, Reino Unido). Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo con una columna de HPLC Sunfire C18 ( $150 \times 2,1\text{ i.d.}, 5,0\text{ mm}$ ) (Waters, Manchester, Reino Unido).

### 5.2.3. Condiciones HPLC-MS/MS

La determinación de tetraciclinas mediante HPLC-MS/MS se llevó a cabo de acuerdo a un método publicado previamente (Gavilán y col, (2016)). Los análisis cromatográficos realizaron inyectando 25 µl de extracto a la columna de cromatografía. Las fases móviles A y B se mezclaron según un gradiente y con un flujo de 0,25 ml/min. El autosampler y la temperatura de la columna se programaron a 8 °C y 35°C, respectivamente. Como indican las pautas de la Decisión 2002/657/CE, las tetraciclinas se identificaron en base a sus transiciones MRM y a su Rt.

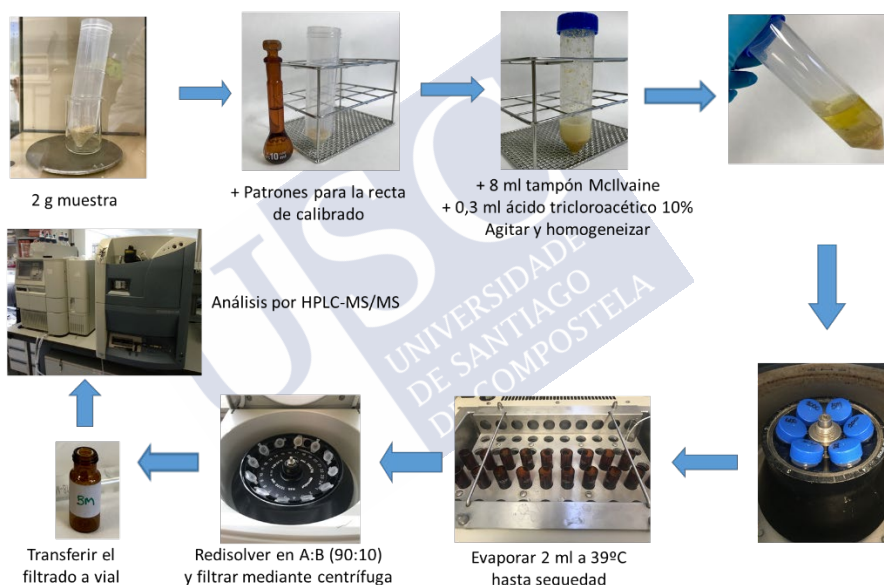
Se estableció una ionización en electrospray (ESI) en el MS triple cuadrupolo para evaporar la fase móvil procedente del HPLC y para ionizar las tetraciclinas. Los analitos se detectaron en modo ion positivo y bajo las siguientes condiciones: Voltaje del capilar: 3 kV; temperatura de la fuente: 120°C; temperatura de desolvatación: 350°C; flujo de gas en el cono: 49 l/h; flujo del gas de desolvatación: 650 l/h.

### 5.2.4. Extracción de las muestras

El proceso de extracción de muestras se basó en un trabajo previo (Anderson y col., 2005). Antes del análisis de la muestra, se prepararon curvas de calibración con matrices adicionadas. Para ello, se añadieron diferentes volúmenes de la solución de trabajo con las tetraciclinas a 2 g de pienso, carentes de tetraciclinas y se agitaron en la oscuridad durante 30 minutos. Las concentraciones de tetraciclinas en las muestras dopadas de pienso fueron 0; 400; 800; 1200; 1400 y 1600 µg/kg.

Para extraer las tetraciclinas de las muestras de pienso, se trituraron 2 g de pienso, y se añadieron 8 ml de tampón McIlvaine, 300 µl de TCA y 0,1 ml de solución de trabajo de IS; todo ello en un tubo de 50 ml de polipropileno. Después de agitar la muestra en la oscuridad durante 10 min para conseguir un efecto homogéneo, se

añadieron 6 ml de acetato de etilo y las muestras se agitaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 20 min. Después, se centrifugaron durante 15 min a 4500 rpm, se transfirieron 2 ml de sobrenadante a un tubo ámbar de 10 ml cónico, evaporándose este extracto a sequedad en un turbo-evaporador. El residuo final se disolvió en 0,5 ml de una mezcla de los componentes de las fases móviles (90A:10B) y se agitó en vórtex. Para filtrar el extracto final, se utilizaron filtros de centrífuga y se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 min. El filtrado se transfirió a un vial HPLC con microinsert de 0,3 ml y se almacenó a -18°C hasta su análisis.



**Figura 5.1. Protocolo de extracción de tetraciclinas en piensos para su detección y cuantificación a nivel de residuos**

### 5.2.5. Validación del método

Las directrices seguidas para la validación del método y la interpretación de resultados fueron las indicadas en la Decisión 2002/657/CE, que establece los criterios y procedimientos para la

validación de los métodos analíticos asegurando la calidad y la similitud de los resultados analíticos generados por laboratorios oficiales.

Se investigaron aspectos tales como la recuperación, precisión (bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad), especificidad y aplicabilidad/robustez/estabilidad del método. Para la validación, se preparó una tanda de muestras de matriz fortificada, consistentes en 21 muestras adicionadas con tetraciclinas a seis concentraciones (0; 400; 800; 1200; 1600 y 4000  $\mu\text{g/kg}$ ). Para las concentraciones de 400; 800 y 1200  $\mu\text{g/kg}$ , se prepararon seis réplicas y para las concentraciones restantes (0; 1600 y 4000  $\mu\text{g/kg}$ ), sólo una muestra de cada una. Las muestras dopadas con las tetraciclinas se agitaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 10 min para homogeneizarlas. Después, se aplicó el procedimiento de extracción detallado anteriormente. Todo el procedimiento realizado con las 21 muestras se repitió dos veces en otros dos días diferentes. Además, se prepararon dos muestras de reactivo para el control; un blanco de reactivo (conteniendo sólo los reactivos) y un reactivo fortificado (conteniendo 1.200  $\mu\text{g/kg}$  de tetraciclinas y los reactivos).

También, se analizaron veinte muestras de pienso para determinar selectividad/especificidad. Diez de ellas fueron dopadas con tetraciclinas al nivel de validación (800  $\mu\text{g/kg}$ ) y con 400  $\mu\text{g/kg}$  de fármacos antimicrobianos utilizados comúnmente en producción de alimentos de origen animal (sulfadiazina, sulfametoxazol y trimetoprim). Las otras diez muestras se analizaron sin añadirles ningún fármaco.

$\text{CC}\alpha$  y  $\text{CC}\beta$  se determinaron como se describe en Freitas y col. (2014), siguiendo los requerimientos de la Decisión 2002/657/CE y tomando como base el nivel de validación de 800  $\mu\text{g/kg}$ .



### **5.2.6. Muestras**

Las muestras de piensos fueron tomadas de 50 granjas de producción de leche localizadas en Galicia, para investigar la presencia de residuos de tetraciclinas en piensos consumidos por las vacas que están produciendo leche diariamente. Además, las fábricas de piensos aportaron muestras para investigar los niveles de contaminación por transferencia de tetraciclinas después de fabricar piensos medicados. Los procedimientos de muestreo en ambos casos fueron llevados a cabo según los requerimientos del Reglamento 691/2013. Las muestras de pienso se almacenaron a temperatura ambiente y en la oscuridad con el objeto de utilizar condiciones similares a las de almacenamiento en la industria y las granjas.

La composición de las muestras de pienso, según sus etiquetas, fueron maíz modificado genéticamente (entre 36 y 15%), harina de soja obtenida de soja modificada genéticamente (presente en algunas muestras, entre el 4 y el 38%); harina de colza (presente en algunas muestras, entre 3 y 47%) y cebada (presente en algunas muestras, entre 6 y 18%); cada muestra de pienso tenía su composición particular, dependiendo normalmente de la especie de destino. En cuanto a su composición nutricional, las muestras de pienso presentaban un 18 a 26% de proteína cruda, un 4 a 10% de fibra cruda, entre un 2,5 y 6% de grasa cruda, un 6 a un 10% de cenizas crudas y sodio, entre 0,7% y 4%.

## **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS**

Las tetraciclinas tienen más de tres grupos hidroxilo que son fácilmente ionizables mediante ESI para lograr su detección. Así pues, ESI se utiliza comúnmente para la ionización de tetraciclinas cuando el análisis se lleva a cabo mediante HPLC-MS/MS, independientemente del tipo de matriz (Boscher y col., 2010; Blasco y col., 2009; Zue y col. 2006). Para optimizar los parámetros del MS y

obtener una señal intensa, se infundieron directamente soluciones individuales de cada tetraciclina a una concentración de 1 µg/ml. Seleccionando para cada analito un ion precursor y dos iones producto (Tabla 5.1). Con el HPLC-MS/MS operando en modo MRM, se emplearon dos transiciones y el  $R_t$  para obtener cuatro puntos de identificación para cada una de las tetraciclinas, tal como establece la Decisión 2002/657/CE.

**Tabla 5.1.  $R_t$  (min), iones precursor y producto ((m/z)<sup>+</sup>), CV (V) y EC (V) empleados para la identificación de las tetraciclinas**

| TETRACICLINA     | $R_t$ | (m/z) <sup>+</sup> | CV | EC |
|------------------|-------|--------------------|----|----|
| Tetraciclina     | 12,63 | 445>410*           | 30 | 29 |
| Tetraciclina     |       | 445>154            | 30 | 27 |
| Doxiciclina      | 13,64 | 445>428*           | 30 | 20 |
| Doxiciclina      |       | 445>125            | 30 | 27 |
| Clortetraciclina | 11,84 | 479>462*           | 30 | 23 |
| Clortetraciclina |       | 479>444            | 30 | 23 |
| Oxitetraciclina  | 12,61 | 461>443*           | 30 | 20 |
| Oxitetraciclina  |       | 461>426            | 30 | 20 |
| Democociclina    | 12,00 | 465>448*           | 30 | 17 |

\*Transiciones MRM empleadas para la cuantificación

Hay que resaltar que con otros métodos de detección, tales como el DAD o el detector de fluorescencia, sólo se obtiene un punto de identificación y se requieren más pasos para identificar las sustancias. Los iones precursor e iones producto identificados en esta investigación coinciden con los publicados por otros autores para la determinación de tetraciclinas en pienso, jalea real y músculo (Boscher y col., 2010; Blasco y col., 2009). El gradiente de separación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente; no obstante, se observó un aumento de la presión en la fase móvil que podía causar el colapso del sistema, por lo que se recomienda aplicar una temperatura de 35 °C a la columna.

### 5.3.2. Optimización del protocolo de extracción

En base a métodos publicados anteriormente para análisis de tetraciclinas en matrices de alimentos y de piensos (Boscher y col., 2010; Freitas y col., 2014; Fernández-González y col., 2002) se probaron diferentes protocolos de extracción empleando acetato de etilo, hexano, acetonitrilo, metanol y diclorometano. En todos los casos, se obtuvieron bajos niveles de recuperación, debido a la tendencia de las tetraciclinas a formar complejos quelantes con diferentes cationes. Así pues, una extracción inicial con tampón McIlvaine/EDTA dio resultados satisfactorios, como había sido descrito previamente (Aguilera-Luiz y col., 2003; Cristofani y col., 2009; Cinquina y col., 2003; Tong y col., 2009). Las tetraciclinas disueltas en la solución McIlvaine/EDTA se extrajeron con acetato de etilo, ya que estas dos soluciones son inmiscibles y la separación se pudo conducir fácilmente. Con el fin de purificar el extracto, otros autores emplean cartuchos SPE tales como OASIS (Stolker y col., 2013), SPE dispersivos (Boscher y col., 2010) en vez de acetato de etilo. El uso de SPE se evitó en este caso para reducir tiempo y coste del análisis, ya que se obtuvieron resultados satisfactorios con el método desarrollado.

Como ya se ha comentado reiteradamente, los piensos se elaboran con multitud de materias primas de origen animal y vegetal, así como subproductos industriales y farmacéuticos. Como los ingredientes de los piensos varían dependiendo del tipo de animal al que están destinados y de sus necesidades, el análisis de tetraciclinas podría complicarse dando lugar a más interferencias, particularmente teniendo en cuenta que el contenido de grasa varía. El método utilizado en este estudio ha sido probado en piensos para vacuno productor de leche y de carne, aves ponedoras, pollos de engorde y conejos. Se obtuvieron resultados satisfactorios en todos los casos. Estas matrices fueron analizadas preparando curvas de calibración con matrices fortificadas de cada tipo de pienso, dependiendo de la especie a la que estaba destinado.

### 5.3.3. Validación del método

Las curvas de calibración para cuantificar las concentraciones de tetraciclinas se obtuvieron dopando muestras de pienso con los analitos a diferentes concentraciones. Si el coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) es inferior a 0,98, se repite el proceso de extracción.

Incluso aunque para 300  $\mu\text{g/kg}$  el ratio S/N fue superior a 10, la validación se realizó para 800  $\mu\text{g/kg}$  para obtener resultados aceptables a 0,5; 1 y 1,5 veces el nivel de validación recomendado por la Decisión 2002/657/CE. La Figura 5.2 muestra los cromatogramas de una muestra de blanco, la Figura 5.3 muestra los de una muestra de blanco adicionada con las tetraciclinas a 400  $\mu\text{g/kg}$  y la Figura 5.4 muestra las transiciones MRM empleadas para cada tetraciclina en una de las muestras enriquecidas con 400  $\mu\text{g/kg}$ .

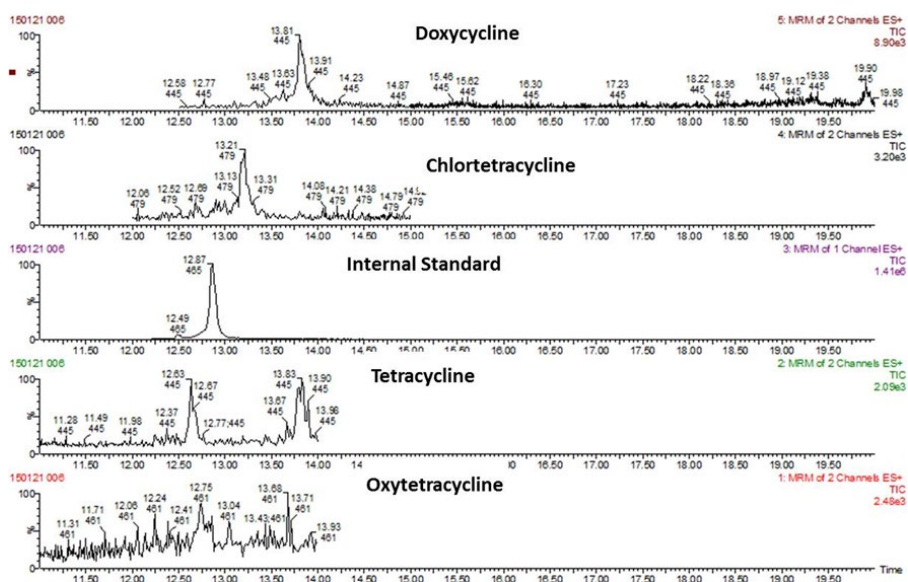


Figura 5.2. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra de blanco

## Desarrollo de un método para la determinación de residuos de tetraciclinas en piensos

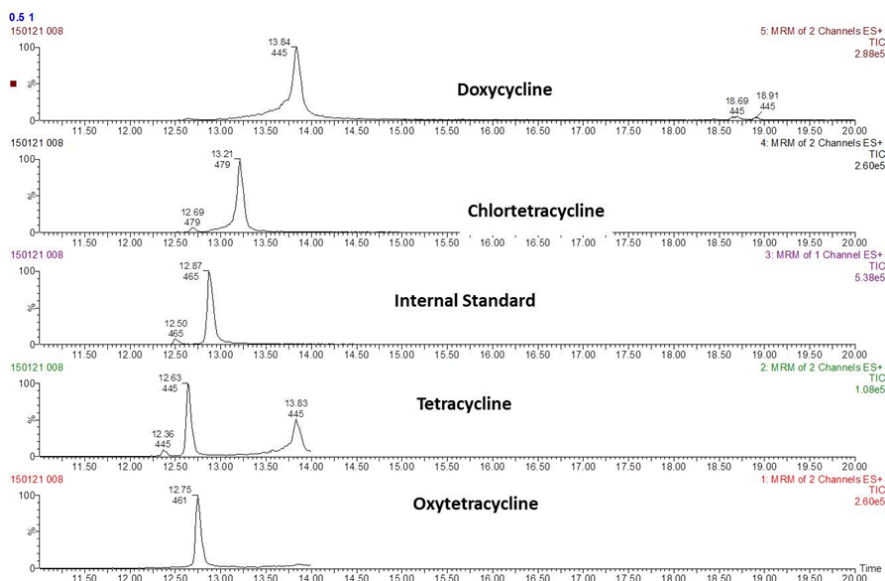


Figura 5.3. Cromatogramas MRM de tetraciclinas en una muestra fortificada a 400 µg/kg.

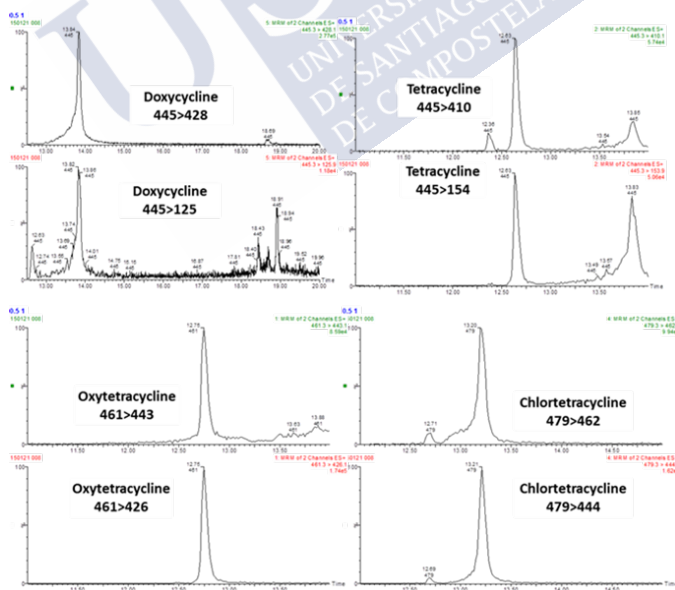


Figura 5.4. Cromatogramas MRM de las tetraciclinas individuales en una muestra enriquecida con 400 µg/kg

No se pudo disponer de materiales de referencia, por lo que la veracidad del método se calculó en términos de recuperación. Los resultados obtenidos durante la validación se enumeran en la Tabla 5.2. La recuperación fue baja comparada con otros métodos publicados. De todas formas, la gran ventaja de este protocolo de extracción es que no requiere extracción en fase sólida y las cuatro tetraciclinas principales pueden identificarse y cuantificarse simultáneamente.

**Tabla 5.2. Recuperaciones (%),  $RSD_r$ ,  $RSD_R$ ,  $CC\alpha$  ( $\mu\text{g/kg}$ ),  $CCB$  ( $\mu\text{g/kg}$ ),  $LDD$  ( $\mu\text{g/kg}$ ),  $LDC$  ( $\mu\text{g/kg}$ ), de tetraciclinas**

| TETRACICLINA     | Nivel | Recuperación | $RSD_r$ | $RSD_R$ | $CC\alpha$ | $CCB$ | $LDD$ | $LDC$ |
|------------------|-------|--------------|---------|---------|------------|-------|-------|-------|
| Clortetraciclina | 89    | 11           | 11      | 13      | 146        | 249   | 35    | 400   |
|                  | 91    | 12           | 12      | 13      |            |       |       | 800   |
|                  | 111   | 17           | 17      | 23      |            |       |       | 1200  |
| Doxiciclina      | 93    | 16           | 16      | 22      | 205        | 344   | 100   | 400   |
|                  | 113   | 15           | 15      | 17      |            |       |       | 800   |
|                  | 109   | 17           | 17      | 19      |            |       |       | 1200  |
| Oxitetraciclina  | 103   | 16           | 16      | 20      | 198        | 315   | 40    | 400   |
|                  | 90    | 12           | 12      | 22      |            |       |       | 800   |
|                  | 103   | 15           | 15      | 20      |            |       |       | 1200  |
| Tetraciclina     | 78    | 12           | 12      | 13      | 92         | 164   | 24    | 400   |
|                  | 95    | 12           | 12      | 13      |            |       |       | 800   |
|                  | 100   | 10           | 10      | 10      |            |       |       | 1200  |

Los resultados para la repetibilidad, calculados como la media de las  $RSD$  ( $n=6$ ) para cada concentración cada día de la validación, fueron inferiores al 17% para clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina (Tabla 5.2). Los resultados de reproducibilidad, calculados como la  $RSD$  de 21 muestras a la misma concentración, fueron inferiores a 23% para todas las tetraciclinas (Tabla 5.2).

Para determinar la selectividad/especificidad, se analizaron 10 muestras blanco y las mismas muestras dopadas con las cuatro tetraciclinas a 800 µg/kg. La correcta identificación de las tetraciclinas y la ausencia de picos cromatográficos de interferencia en sus  $R_t$  demostraron la selectividad/especificidad del método.

El LDD y el LDC del método se calcularon y verificaron con muestras de pienso adicionadas con las tetraciclinas a diferentes concentraciones. En base a la relación S/N superior a 3 para LDD y superior a 10 para LDC, el LDD y el LDC del método fueron establecidos a 35 y 47 µg/kg para la clortetraciclina, 40 y 60 µg/kg para la oxitetraciclina, 24 y 40 µg/kg para la tetraciclina y 100 y 150 µg/kg para la doxamiciclina.

CC $\alpha$  y CC $\beta$  se determinaron utilizando las condiciones establecidas para sustancias que no disponen de límites permitidos. CC $\alpha$  y CC $\beta$  fueron más altos que LDD y LDC para todos los compuestos, lo que implica que las tetraciclinas detectadas a un nivel superior al CC $\beta$  serán positivas y los niveles de tetraciclinas serán cuantificables; CC $\alpha$  y CC $\beta$  para clortetraciclina, doxamiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina fueron inferiores a 400 µg/kg (Tabla 5.2).

Los resultados de la validaciones ya publicadas han mostrado en algunos casos, mayor repetibilidad, reproducibilidad y un LDC inferior, tales como el trabajo dirigido por Boscher y col., que en 2010 publicaron una RSD inferior al 12% y LDC de 20 µg/kg. De forma similar, el método publicado por Stolker y col. (2013) obtuvo un LDC de 0,1 mg/kg para doxamiciclina y oxitetraciclina. De todas formas, habría que resaltar que ninguno de los métodos publicados, basándonos en los datos disponibles, ha sido validado de acuerdo a la Decisión 2002/657/CE.

### **5.3.4. Resultados de las muestras analizadas**

De 75 muestras de pienso investigadas, la oxitetraciclina fue la tetraciclina detectada más frecuentemente, presente en el 8% de las muestras ( $n=6$ ); su rango de concentración estaba entre 90 y 400  $\mu\text{g/kg}$ . Por otro lado, la tetraciclina y la doxiciclina fueron las que menos se detectaron. Cada tetraciclina fue detectada individualmente en distintas muestras y sus concentraciones se encontraban entre 150 y 120  $\mu\text{g/kg}$ . La clortetraciclina fue el fármaco detectado a mayor concentración en este estudio: 15,14 mg/kg en muestras de pienso para terneros. Es importante destacar que el consumo de pienso contaminado a un nivel de 15,14 mg/kg podría causar problemas de seguridad alimentaria, dando lugar a alimentos contaminados.

### **5.4. CONCLUSIONES**

Se ha demostrado la transferencia inevitable durante la fabricación de piensos de fármacos veterinarios, tales como coccidiostáticos y el caso del grupo de las tetraciclinas puede ser considerado un caso similar, ya que por su bajo coste, es frecuente su utilización en la producción animal.

En este trabajo de investigación se ha desarrollado un método simple y rápido para el análisis de cuatro tetraciclinas reguladas en la producción de alimentos de origen animal (clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina). El método fue validado de acuerdo a las directrices europeas y fue aplicado exitosamente en el análisis de 75 muestras de piensos no destinatarios. Los resultados mostraron la presencia de tetraciclinas en un 15% de las muestras, indicando que la contaminación cruzada ocurre y que tal como establece el Reglamento 2019/4, en un futuro próximo (2023) deberán establecerse LM para tetraciclinas en piensos no destinatarios.



## 5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera-Luiz, M. M., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Vidal, J. L. M., Frenich, A. G. (2013). Wide-scope analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(20), 6543-6553.

Anderson, C. R., Rupp, H. S., Wu, W. H. (2005). Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075(1-2), 23-32.

Blasco, C., Di Corcia, A., Picó, Y. (2009). Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 116(4), 1005-1012.

Boscher, A., Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., Bohn, T. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6394-6404.

Cherlet, M., Schelkens, M., Croubels, S., De Backer, P. (2003). Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492(1-2), 199-213.

Cinquina, A. L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., Cozzani, R. (2003). Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline,

chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *Journal of Chromatography A*, 987(1-2), 227-233.

Cristofani, E., Antonini, C., Tovo, G., Fioroni, L., Piersanti, A., Galarini, R. (2009). A confirmatory method for the determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytica chimica acta*, 637(1-2), 40-46.

Decisión de la Comisión 2002/657/CE, del 12 de Agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva del Consejo 96/23/CE, concerniente a los métodos analíticos y a la interpretación de resultados". *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L2221; 17 de agosto de 2002; 8-36.

Eurostat (2015). Pocketbooks. Food: from farm to fork statistics. Accedido en febrero 2018 a través de <http://ec.europa.eu/eurostat/documents/3930297/5966590/ks-32-11-743-EN.PDF/64ace8f7-ea9f-431c-81cd-83ef3a601ea6>

Fernández-González, R., García-Falcón, M. S., Simal-Gándara, J. (2002). Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 455(1), 143-148.

Freitas, A., Barbosa, J., Ramos, F. (2014). Multi-residue and multi-class method for the determination of antibiotics in bovine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Meat science*, 98(1), 58-64.

Gavilán, R., Nebot, C., Miranda, J., Martín-Gómez, Y., Vázquez-Belda, B., Franco, C., Cepeda, A. (2016). Analysis of tetracyclines in medicated feed for food animal production by HPLC-MS/MS. *Antibiotics*, 5(1), 1-10.

Kools, S. A., Moltmann, J. F., Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(1), 59-65.

Martins, M. T., Melo, J., Barreto, F., Hoff, R. B., Jank, L., Bittencourt, M. S., Schapoval, E. E. S. (2014). A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 129, 374-383.

Mevius, D. J., Sprenger, M. J. W., Wegener, H. C. (1999). EU conference 'the microbial threat'. *International journal of antimicrobial agents*, 11(2), 101-105.

Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2), 109-133.

Reglamento 124/2009 de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que establece los contenidos máximos de coccidiostáticos e histomóstatos presentes en los alimentos como resultado de la transferencia inevitable de estas sustancias en los piensos a los que no están destinadas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L40, 11 de febrero de 2009; 7-11.

Reglamento 37/2010, sobre sustancias farmacológicamente activas y su clasificación teniendo en cuenta los límites máximos residuales en alimentos de origen animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L15, 20 de enero de 2010; 1-72.

Reglamento nº 574/2011 de la Comisión, de 16 de junio de 2011, por el que se modifica el Anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melanina y *Ambrosia* spp. y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonóstatos y por la que se

consolidan sus Anexos I y II. *Diario Oficial de la Comunidad Europea*. L159, 17 de junio de 2011; 7-24.

Reglamento 691/2013, de 16 de julio de 2013, que modifica el Reglamento (CE) nº 152/2009 en cuanto a los métodos de muestreo y análisis. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L197; 20 de julio de 2013; 1-12.

Sapkota, A. R., Lefferts, L. Y., McKenzie, S., Walker, P. (2007). What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. *Environmental health perspectives*, 115(5), 663-670.

Senyuva, H. Z., Gilbert, J., Türköz, G., Leeman, D., Donnelly, C. (2012). Analysis of Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2, and HT-2 Toxins in Animal Feed by LC/MS/MS—A Critical Comparison of Immunoaffinity Column Cleanup with No Cleanup. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1701-1708.

Sharma, V., Wadhwa, B. K., Stan, H. J. (2005). Multiresidue analysis of pesticides in animal feed concentrate. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 74(2), 342-349.

Stolker, A. A. M., Rutgers, P., Oosterink, E., Lasaroms, J. J. P., Peters, R. J. B., Van Rhijn, J. A., Nielen, M. W. F. (2008). Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(6), 2309-2322.

Stolker, A. A. M., Manti, V., Zuidema, T., van Egmond, H., Deckers, E. R., Herbes, R., Hooglugt, J., Olde Heuvel, E., de Jong, J. (2013). Carry-over of veterinary drugs from medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(6), 1100-1107.

Tong, J., Rao, Q., Zhu, K., Jiang, Z., Ding, S. (2009). Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. *Journal of separation science*, 32(23-24), 4254-4260.

Van Poucke, C., De Keyser, K., Baltusnikiene, A., McEvoy, J. D. G., Van Peteghem, C. (2003). Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Analytica Chimica Acta*, 483(1-2), 99-109.

Varzakas, T., Demopoulos, V., Manolopoulou, E. (2011, September). Detection of aflatoxins, trichothecenes and zearalenone in food and animal feed by reversed phase HPLC and SPE. In *International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits 963* (pp. 119-128).

Viñas, P., Campillo, N., Carrasco, L., Hernandez-Cordoba, M. (2007). Analysis of nitrofurán residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection. *Chromatographia*, 65(1-2), 85-89.

Yue, Z., Qiu, Y., Liu, X., Ji, C. (2006). Determination of multi-residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 34(9), 1255-1259.



## **CAPÍTULO 6**

# **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE FENICOLES EN PIENSOS**

### **6.1. INTRODUCCIÓN**

La globalización ha dado lugar a que alimentos producidos en un determinado país se puedan vender en otros países, incluso, a niveles intercontinentales. Sin embargo, esto contribuye a aumentar la competencia entre las empresas alimentarias y como consecuencia, afecta a la producción de alimentos. El objetivo final de cualquier tipo de negocio es tener un coste de producción lo más bajo posible y unos beneficios muy altos. En el caso concreto de la producción animal, bajar el coste de producción es muy importante ya que los ganaderos no sólo deben hacer crecer/engordar a los animales, sino también luchar contra las diferentes enfermedades que puedan afectar a la salud de dichos animales y para ello, se recurre al uso de medicamentos veterinarios cuando es necesario, práctica que está permitida en producción animal con el objetivo de controlar, prevenir y tratar enfermedades. Tal y como se mencionó, los medicamentos más utilizados incluyen el grupo de los antimicrobianos y el de los antiparasitarios. Dentro del grupo de antimicrobianos se encuentran los fenicoles. Esta familia incluye el cloranfenicol, que tiene un amplio espectro de acción, sin embargo, como ya se ha indicado en el apartado 1.3.4 del Capítulo 1 Introducción, el uso de cloranfenicol está prohibido en la Unión Europea (Reglamento 37/2010/CE) para animales productores de alimentos. En cambio, está

permitido el empleo del florfenicol y el tianfenicol, que también pertenecen a la misma familia de antimicrobianos. Estos dos compuestos se administran frecuentemente a través de los piensos y según el reciente Reglamento 2019/4 se debe controlar la contaminación cruzada de dichas sustancias durante la fabricación de piensos medicados. Por lo tanto, será necesario disponer de métodos capaces de detectar estos compuestos a niveles residuales ( $\mu\text{g/kg}$ ).

Para el análisis de fenicoles en matrices tales como plasma sanguíneo, tejido animal, leche y miel, se han empleado técnicas de extracción basadas en SPE (Orlando y col., 2016), impresión molecular MIPs (Ge y col., 2010), polímeros modificados químicamente (del inglés fabric phase sortive extraction, FPSE), (Samanidou y col., 2016), extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe), (Liu y col., 2016) y técnicas de detección tales como electroforesis capilar (Kowalski y col., 2005), inmunoensayos (An y col., 2016; Luo y col., 2011), HPLC-UV (Hayes y col., 2013), HPLC-MS/MS (Rezende y col., 2012), o UHPLC (Pan y col., 2015). Asimismo, hay que resaltar que según la Decisión 2002/657/CE las muestras positivas deben ser analizadas por métodos confirmatorios. A pesar de que existen diversos métodos de HPLC-MS/MS en matrices alimentarias (Rezende y col., 2012; Pan y col., 2015), comparados con otro grupos de antimicrobianos tales como tetraciclinas, sulfonamidas, penicilinas, el número de métodos para fenicoles es mucho menor. Esto es comprensible, ya que según el informe ESVAC de 2015, estos tres grupos de antimicrobianos representaron aproximadamente el 70% de las ventas totales de antimicrobianos de la UE.

Los métodos de HPLC-MS/MS publicados para fenicoles incluyen el de Van de Riet y col. (2013) para determinar cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol en músculo de pescado, el desarrollado por Barreto y col. (2016) para muestras de aves, cerdos, bovino y músculo de pescado, el de Anderson y col. (2016) para determinar florfenicol y tianfenicol en ciervos de cola blanca, el publicado por Liu y col. (2016) para leche y miel y el más reciente descrito por Xie y col.



(2018) para huevo. Atendiendo únicamente a métodos descritos para piensos, podemos hablar del método descrito por Pietroń y col. (2014) basado en HPLC-UV para la cuantificación de florfenicol y tianfenicol en piensos medicados y otro posterior, similar, basado en una purificación del extracto por cromatografía de capa fina (TLC) (Yang y col., 2017). Para niveles trazas la técnica más empleada es HPLC con diferentes tipos de espectrómetros de masas como detectores. Pero en general, la mayoría de los métodos son de cribado (Boix y col., 2014; Robert y col., 2015; Aguilera-Luiz y col., 2015; Gómez-Pérez y col., 2015; León y col., 2016). Hay que decir que se han publicado métodos confirmatorios que son laboriosos, debido al empleo de PSA (Boscher y col., 2010) y SPE (Piatkowska y col., 2016).

En base a los conocimientos actuales de los autores, no se ha encontrado ningún método en la literatura científica capaz de analizar cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol a niveles trazas en piensos y que haya sido validado siguiendo los requisitos de la Decisión 2002/657/CE. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es presentar un protocolo de extracción simple y sencillo, seguido de una detección por HPLC-MS/MS para la identificación y cuantificación de tres fenicoles a niveles de contaminación cruzada en muestras de piensos de diferentes especies de animales.

## **6.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.2.1. Compuestos, reactivos y soluciones de trabajo**

Florfenicol, tianfenicol, cloranfenicol, cloranfenicol- $d_5$  (pureza >98%) se obtuvieron a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), el cloranfenicol- $d_5$  se empleó como patrón interno (IS). El acetato de etilo y el acetonitrilo se obtuvieron de Scharlau (Barcelona, España), el ácido fórmico y el acetato de amonio (pureza > 99% para el análisis) de Acros Organics (Geel, Bélgica). El agua empleada se obtuvo por un sistema de purificación de agua Milli-Q® de Millipore

(Bedford, MA, EE.UU.). Se utilizó un generador de nitrógeno de la marca Peak Scientific Instruments (Chicago, IL, EE.UU.).

Se pesaron con precisión  $20 \pm 0,01$  mg de cada analito y se transfirieron a un matraz ámbar de 20 ml, las soluciones se prepararon en acetonitrilo, siempre considerando la pureza del reactivo. Una vez obtenidos los patrones individuales se realizó una solución patrón mezcla de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol con una concentración de cada analito de 10 µg/mL. Todos los patrones se almacenaron en la oscuridad a -18°C durante un período máximo de tres meses.

### **6.2.2. Equipamiento**

Se utilizaron los siguientes equipos: molinillo Minimoka GR020 (Lleida, España), agitador orbital G25 de New Brunswick Scientific (Nueva Jersey, EEUU), centrífuga modelo H-103N (Kokusan, Tokio, Japón), turboevaporador modelo Turbo Vap II de Zyrmark (Hopkinton, MA, EEUU), agitador vortex (IKA Minishaker MS2, Staufen, Alemania), filtros de jeringa GHP Acrodisc (0,2 µm; Waters Corporation, MA, EEUU).

Los análisis por HPLC-MS/MS se realizaron utilizando un HPLC modelo 1100 de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) acoplado a un detector de masas modelo Qtrap 2000 <sup>TM</sup> MS de Applied Biosystems/MDS-Sciex (Toronto, Canadá), todo controlado por medio del software Analyst 1.4.1 también de Applied Biosystems (Toronto, Canadá).

### **6.2.3. Condiciones HPLC-MS/MS**

Un volumen de 40 µL de extracto de fenicoles se inyectó en una columna de HPLC Sunfire C18 (3,5 µm 2,1 x 150 mm) de Waters (Milford, PA, EEUU) mantenida a una temperatura constante de 50

°C. Para la Fase móvil A se emplearon 370 µL de formato de amonio en 1 litro de agua Milli-Q® y para la Fase móvil B se empleó sólo acetonitrilo, ambas soluciones se mezclaron a modo de gradiente a un flujo constante de 250 µL/min. El programa de gradiente empleado fue el siguiente: 0 min, 90% A; 1 min, 50% A; 5 min, 7 min, 90% A; 17 min, 90% A.

Por otro lado, la detección por espectrómetro de masas se realizó empleando ionización por ESI en modo negativo. El gas de nebulización 1 y 2 a 50 psi, la temperatura de la fuente a 475 °C y el voltaje de la fuente a -4.500 V. Florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol se identificaron por su Rt en dos transiciones MRM y el cloranfenicol-d<sub>5</sub> por su Rt en una única transición. La Tabla 6.1 recopila los parámetros de MS empleados para la identificación de cada analito.

**Tabla 6.1. Rt (min), iones precursor y producto ((m/z)\*), CV (V), EC (V) empleados para la identificación de fenicoles**

| FENICOL                      | Rt   | (m/z)*   | CV | EC |
|------------------------------|------|----------|----|----|
| Cloranfenicol                | 6,71 | 320>151* | 46 | 26 |
| Cloranfenicol                |      | 320>120  | 46 | 32 |
| Tianfenicol                  | 5,93 | 353>184* | 56 | 20 |
| Tianfenicol                  |      | 353>79   | 56 | 27 |
| Florfenicol                  | 6,57 | 335>185* | 61 | 23 |
| Florfenicol                  |      | 335>79   | 61 | 23 |
| Cloranfenicol-d <sub>5</sub> | 6,69 | 325>157  | 41 | 32 |

\*Transiciones MRM empleadas para la cuantificación

#### 6.2.4. Extracción de las muestras

Para poder realizar la extracción de manera adecuada se trituraron todas las muestras. La presencia de cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol se determinó empleando muestras de pienso blancas. Una vez confirmada la ausencia de fenicoles se realizaron seis submuestras a las cuales se adicionaron alícuotas de la solución patrón mezcla de fenicoles para obtener las siguientes concentraciones finales de cada analito: 0; 100; 200; 300; 400 y 1.000 µg/kg.

Un gramo de pienso molido se transfirió a un tubo cónico Falcon de 15 mL al que se le añadieron 2 mL de agua Milli-Q® y 5 mL de acetato de etilo. Se tapó el tubo Falcon y la mezcla se agitó en un vortex durante unos 10 s, posteriormente se mantuvieron las muestras en un agitador orbital durante 30 min a 200 rpm y se centrifugó a 7.000 rpm durante 15 min. Separadas las tres fases (fase sólida, fase acuosa y fase orgánica) se tomaron 2 ml de la fase orgánica y se transfirió a un tubo de vidrio cónico para su evaporación a sequedad con corriente de aire. El residuo seco se re-disolvió en 500  $\mu$ L de agua Milli-Q® y se pasó por filtros de jeringa, el filtrado se guardó en un vial ámbar de HPLC con un inserto y se almacenó a -18 °C hasta su análisis, que normalmente se realizó en menos de 24 horas. La Figura 6.1 ilustra este protocolo de extracción.



Figura 6.1. Protocolo de extracción de fenoles presentes en pienso

### 6.2.5. Validación del método

Durante la validación del método desarrollado se determinaron y evaluaron parámetros tales como la linealidad, recuperación, precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, selectividad/especificidad, LDD, LDC, CC $\alpha$  y CC $\beta$ . La validación se llevó a cabo siguiendo los criterios contemplados en la Decisión 2002/657/CE y empleando muestras de pienso carentes de los residuos de los analitos objeto de estudio. Para verificar la linealidad se prepararon cuatro lotes de seis muestras a las cuales se les añadieron diferentes cantidades de fenicoles hasta alcanzar las siguientes concentraciones de cada uno de ellos: 0, 100, 200, 300, 400 y 1000  $\mu\text{g/kg}$ . Las curvas se prepararon durante cuatro días diferentes; en cada día el área del pico de los analitos se correlacionó con su respectiva concentración en el pienso y se aplicó una regresión lineal.

Se estableció como nivel de validación para todos los fenicoles 200  $\mu\text{g/kg}$ , para determinar las recuperaciones y la precisión se emplearon muestras de pienso blancas adicionadas con fenicoles hasta alcanzar las siguientes concentraciones finales: 100, 200 y 300  $\mu\text{g/kg}$ . La RSD<sub>r</sub> se obtuvo de analizar seis réplicas para cada concentración extraídas y analizadas el mismo día; asimismo, la RSD<sub>R</sub> se obtuvo repitiendo este procedimiento en tres días diferentes.

La selectividad/especificidad se evaluó con muestras de pienso blanco de diferentes especies de animales enriquecidas y no enriquecidas con fenicoles en el nivel de validación (200  $\mu\text{g/kg}$ ). Las diferentes muestras fueron proporcionadas por fabricantes de piensos. En la Figura 6.2 puede observarse el cromatograma TIC de una muestra blanco de pienso y en la Figura 6.3 se muestran los cromatogramas MRM de una muestra de pienso a la que se han añadido los analitos a una concentración de 200  $\mu\text{g/kg}$ .

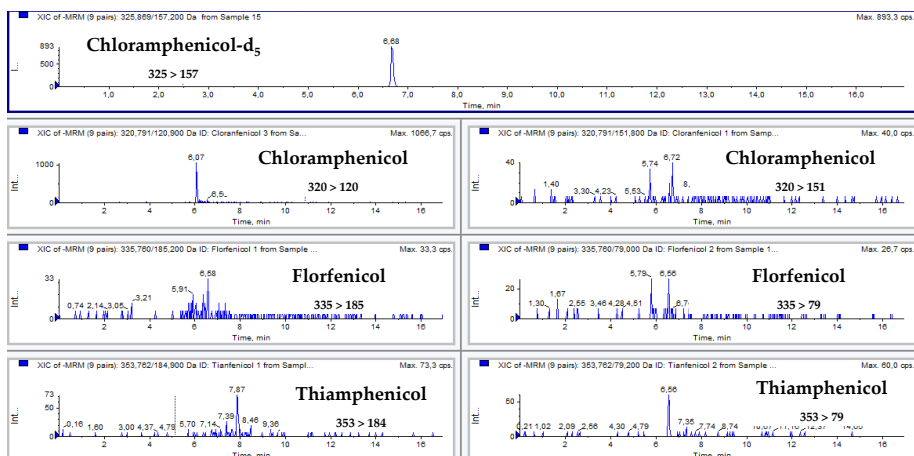


Figura 6.2. Cromatogramas MRM de fenicoles en una muestra de blanco

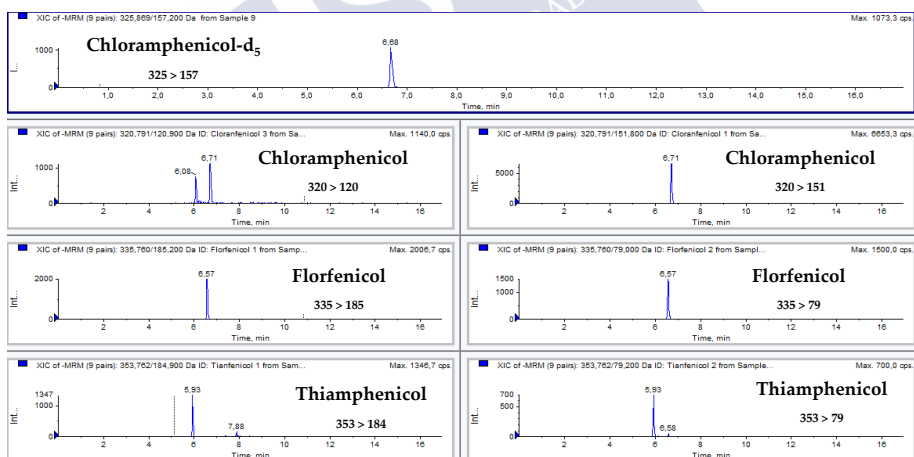


Figura 6.3. Cromatogramas MRM de fenicoles en una muestra enriquecida con 200 µg/kg

### **6.2.6. Muestras**

Los fabricantes de piensos proporcionaron al laboratorio muestras de piensos no destinatarios de diferentes especies de animales (n=30). Estas muestras fueron elaboradas en la misma línea de producción que los piensos medicados con florfenicol y tras el paso de varios lotes de limpieza. También se recogieron un total de 15 muestras en granjas productoras de porcino de Galicia. Una vez en el laboratorio las muestras se molieron y mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su análisis. Por otro lado, 3 muestras del estudio interlaboratorio fueron proporcionadas por el laboratorio europeo de referencia RIKILT (Wageningen, Países Bajos).

## **6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.3.1. Condiciones del equipo HPLC-MS/MS**

Para optimizar las condiciones de detección se emplearon soluciones de patrón de cada analito a una concentración de 1 µg/mL. Estas soluciones se infundieron de manera individual en el MS con el objetivo de establecer diferentes parámetros del MS hasta lograr la mayor intensidad de señal de los iones más representativos de cada fenicol. Se probaron diferentes valores para la presión del gas de nebulización, el voltaje del spray, la temperatura de la fuente y el flujo. La selección de los iones precursores y su optimización se realizó de forma manual, sin embargo, la optimización de la detección de los iones productos se efectuó por el equipo de manera automática, durante este proceso se evaluaron parámetros tales como el EP, el CEP, la EC y el CXP para la producción de los cuatro iones productos más representativos. De estos cuatro iones, dos fueron seleccionados para realizar el análisis MRM de fenicoles.

Los tres fenicoles se ionizaron empleando electrospray en modo negativo debido a las características de la molécula; este modo de ionización también fue empleado por otros investigadores (Zhang y

col., 2008; Boscher y col., 2010; Aguilera-Luiz y col., 2013; Boix y col., 2014; Gómez-pérez y col., 2015; Robert y col., 2015; Boscher y col., 2016; León y col., 2016; Pitakwska y col., 2016; Xie y col., 2018). Como solvente para la fase móvil, se emplearon inicialmente acetonitrilo y agua con tampones tales como acetato de amonio, formiato de amonio e hidróxido de amonio, finalmente se optó por acetonitrilo y agua con acetato de amonio, porque dieron los mejores resultados, alta relación S/N y buena resolución entre picos. Tal y como establece la Decisión 2002/657/EC, se lograron cuatro puntos de identificación para cada uno de los fenicoles con el empleo de dos transiciones MRM, que se emplearon para la identificación y una única para la cuantificación, siendo esta última la transición MRM que proporcionaba la mayor relación S/N. Los iones elegidos para cloranfenicol y florfenicol también fueron empleados por Shinoda y col. (2011) para muestras de pienso y Cronly y col. (2010) para la determinación de cloranfenicol en muestras de leche y miel. Asimismo, los mismos iones se han empleado para matrices tales como aguas residuales y estiércol (Wei y col., 2012), tejidos de aves de corral (Xiao y col., 2015), músculo, hígado y riñones de porcino y en músculo de vacuno, pescado y de pollo (Chou y col., 2009) y en leche y miel (Liu y col., 2016). Para la separación de los analitos se han empleado diferentes columnas C18, tales como LiChrospher, Symmetry Shield RP18, ZORBAX Eclipse Plus, XTerra C18 e Hypersil C18-BD. En particular para este trabajo, se empleó la columna Sunfire C18, que fue elegida en base a los resultados satisfactorios obtenidos con ella para otros analitos.

### **6.3.2. Optimización del protocolo de extracción**

Independientemente del tipo de matriz, los métodos publicados para la determinación de fenicoles emplean una extracción inicial de los analitos con acetato de etilo (Zhang y col., 2008; Xiao y col., 2015; Barreto y col., 2016). En el caso de Xiao y col. (2015) emplearon acetato de etilo para músculo de aves de corral con un sistema de extracción de líquido presurizado. Van de Riet y col.



(2013) eligieron acetona y diclorometano para extraer los fármacos de músculo de pescado. Para muestras de pienso, Boix y col. (2014) utilizaron acetonitrilo con ácido fórmico y León y col. (2016) agua combinada con acetonitrilo tamponado. También se han descrito técnicas de extracción más laboriosas con sales, seleccionadas por Liu y col. (2016) para leche y miel, columnas de inmunoafinidad utilizadas por Luo y col. (2010) para músculo de porcino o polímeros de impresión, empleados por Ge y col. (2010) para tejido animal. En cambio, se obtuvieron resultados satisfactorios con 2 ml de agua y 5 ml de acetato de etilo durante esta investigación, observándose un mayor efecto matriz cuando el volumen de extracto orgánico que se evaporaba era mayor de 2 ml (por ejemplo, 3; 3,5 ó 4 ml).

### **6.3.3. Validación del método**

Tal y como se ha mostrado en los capítulos anteriores, el grupo de investigación ha desarrollado, validado y publicado diversos métodos para el análisis a nivel de trazas de medicamentos veterinarios (coccidiostáticos, sulfamidas y otros antibióticos) en diferentes alimentos de origen animal y piensos y siempre se ha llevado a cabo siguiendo los requisitos establecidos en la Decisión 2002/657/EC (Nebot y col., 2012; Nebot y col., 2014.; Gavilán y col., 2016; Gavilán y col., 2018). Según los resultados de la validación realizada para fenicoles y de acuerdo a lo indicado en el apartado 6.2.5, las recuperaciones estuvieron entre -18% y + 10% para los tres analitos investigados (Tabla 6.2). Por otro lado, los valores de precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad se situaron dentro del rango establecido por la legislación, oscilando entre 12 y el 21% para el cloranfenicol, entre el 6,5 y el 22% para el tianfenicol y entre el 12 y el 19% para el florfenicol.

**Tabla 6.2. Recuperaciones (%),  $RSD_r$ ,  $RSD_R$ ,  $CC\alpha$  ( $\mu\text{g/kg}$ ),  $CC\beta$  ( $\mu\text{g/kg}$ ), LDD ( $\mu\text{g/kg}$ ) y LDC ( $\mu\text{g/kg}$ ) de cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol**

| FENICOLES     | Nivel ( $\mu\text{g/kg}$ ) | Recuperación | $RSD_r$ | $RSD_R$ | $CC\alpha$ | $CC\beta$ | LDD | LDC |
|---------------|----------------------------|--------------|---------|---------|------------|-----------|-----|-----|
| Cloranfenicol | 100                        | 81           | 21      | 16      | 108        | 116       | 25  | 40  |
|               | 200                        | 88           | 12      | 16      |            |           |     |     |
|               | 300                        | 89           | 15      | 19      |            |           |     |     |
|               | Media                      | 86           | 16      | 17      |            |           |     |     |
| Tianfenicol   | 100                        | 81           | 6       | 22      | 140        | 180       | 75  | 100 |
|               | 200                        | 97           | 12      | 21      |            |           |     |     |
|               | 300                        | 104          | 19      | 22      |            |           |     |     |
|               | Media                      | 94           | 12      | 22      |            |           |     |     |
| Florfenicol   | 100                        | 96           | 14      | 19      | 110        | 122       | 50  | 75  |
|               | 200                        | 94           | 13      | 12      |            |           |     |     |
|               | 300                        | 90           | 13      | 15      |            |           |     |     |
|               | Media                      | 94           | 13      | 15      |            |           |     |     |

Actualmente, la presencia de residuos de fenicoles en piensos no destinatarios está prohibida; por lo tanto, los cálculos de  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  se realizaron aplicando la fórmula para sustancias no permitidas en piensos de origen animal, tal como se detalla a continuación: Tras identificar los respectivos picos cromatográficos, el área obtenida se representó en función de la concentración añadida.  $CC\alpha$  se obtuvo como la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de la ordenada en origen. Por otro lado,  $CC\beta$  corresponde al valor de  $CC\alpha$  obtenido más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medio medido en el límite de Decisión. Mientras que los valores de  $CC\alpha$  fueron 108, 140 y 110  $\mu\text{g/kg}$  para cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol respectivamente, los valores de  $CC\beta$  fueron 116, 180 y 122  $\mu\text{g/kg}$  para cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol respectivamente. En todos los casos la relación S/N en el  $CC\alpha$  obtenido era de alrededor de

100, lo que indica que los valores de LDD y LDC son más bajos. Para determinar LDD y LDC se emplearon muestras de pienso enriquecidas con fenicoles. Los resultados indicaron que los valores de LDD y LDC podrían alcanzar 50 µg/kg sin problemas, estableciendo los LDD y LDC en función de los ratios S/N más estables y altos, para garantizar seguridad en los valores de CC $\alpha$  y CC $\beta$ .

Debido al modo de detección empleado (MRM) la técnica demuestra ser selectiva/específica, sin embargo, se evaluó la interferencia de otros picos cromatográficos y la detección de los analitos seleccionados con 20 muestras de pienso blanco de diferentes especies animales. Las muestras se doparon a 200 µg/kg con fenicoles y con otros antibióticos (sulfadiacina, trimetoprim, tetraciclina y ciprofloxacina) como interferentes. La ausencia de picos interferentes en los Rt de los fenicoles en cada una de las correspondientes transiciones, así como la correcta identificación de los analitos corroboró la selectividad/especificidad.

#### **6.3.4. Resultados de las muestras analizadas**

Los análisis de las 3 muestras realizados dentro de los ensayos de intercomparación dieron resultados satisfactorios, confirmando la fiabilidad del método desarrollado. Por otra parte, se investigó la presencia de los tres fenicoles en 30 muestras de las fábricas de pienso que se emplearon para evaluar la contaminación cruzada tras la fabricación de pienso medicado. El florfenicol fue el único analito que se detectó, su presencia se midió en una única muestra a un nivel de 0,36 mg/kg. Esta muestra pertenecía a un grupo de cuatro utilizadas para controlar la contaminación cruzada de florfenicol después de la producción de un pienso medicado de 80 mg/kg de florfenicol. Estos resultados demuestran claramente que el arrastre de florfenicol puede ocurrir durante la fabricación de piensos medicados y que debe controlarse e investigarse con más detalle. Ninguna de las muestras recolectadas en granjas porcinas dio lugar a resultados positivos.

## 6.4. CONCLUSIONES

Se ha descrito un método simple y rápido para la identificación y cuantificación de tres fenicoles (florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol) basado en HPLC-MS/MS en muestras de pienso no destinatario. Dado que el método se validó siguiendo las directrices de la UE y cumplió con los requisitos de la Decisión 2002/657/CE, éste puede ser aplicado por diferentes laboratorios que controlen muestras pertenecientes a los planes de control.

## 6.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera-Luiz, M.M., Romero-González, R.; Plaza-Bolaños, P., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G. (2013). Wide-scope analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405, 6543–6553.

An, L.; Wang, Y., Pan, Y.; Tao, Y., Chen, D., Liu, Z., Yuan, Z. (2016). Development and validation of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of florfenicol and Tiamfenicol in edible animal tissue and feed. *Food Analytical Methods*, 9, 2434–2443.

Anderson, S.C.; Subbiah, S., Gentles, A., Austin, G.; Stonum, P., Brooks, T.A., Smith, E.E. (2016). Qualitative and quantitative drug residue analyses: Florfenicol in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and supermarket meat by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1033, 73–79.

Barreto, F., Ribeiro, C., Hoff, R.B., Dalla Costa, T. (2016). Determination of chloramfenicol, tiamfenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1449, 48–53.

Boix, C.; Ibáñez, M., Sancho, J.V., León, N., Yusá, V., Hernández, F. (2014). Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chemistry* 160, 313–320.

Boscher, A.; Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., Bohn, T. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6394–6404.

Chou, K.Y., Cheng, T.Y., Chen, C.M., Hung, P.L., Tang, Y.Y., Chung-Wang, Y.J., Shih, Y.C. (2009). Simultaneous determination of residual tiamfenicol and florfenicol in foods of animal origin by HPLC/electrospray ionization-MS/MS. *Journal of AOAC International*. 92, 1225–1232.

Cronly, M., Behan, P., Foley, B.; Malone, E., Martin, S.; Doyle, M.; Regan, L. (2010). Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramfenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). *Food Additives and Contaminants*. 2010, 27, 1233–1246.

Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002 Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L221; 17 de agosto de 2002; 8-36.

ESVAC (2015) Fifth ESVAC Report—*Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 26 EU/EEA Countries in 2013*. Accedido en enero de 2017 a través de:

[www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf).

Gavilán, R., Nebot, C., Miranda, J., Martín-Gómez, Y., Vázquez-Belda, B., Franco, C., Cepeda, A. (2016). Analysis of tetracyclines in medicated feed for food animal production by HPLC-MS/MS. *Antibiotics*, 5, 1.

Gavilán, R.E., Nebot, C., Patyra, E., Miranda, J.M., Franco, C.M., Cepeda, A. (2018). Simultaneous analysis of coccidiostats and sulphonamides in non-target feed by HPLC-MS/MS and validation following the Commission Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants*. A, 35, 1093–1106.

Ge, S., Yan, M., Cheng, X., Zhang, C., Yu, J., Zhao, P., Gao, W. (2010). On-line molecular imprinted solid-phase extraction flow-injection fluorescence sensor for determination of florfenicol in animal tissues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52, 615–619.

Gómez-Pérez, M.L., Romero-González, R., Martínez Vidal, J.L., Garrido Frenich, A. (2015). Analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry: Comparison between time-of-flight and Orbitrap. *Food Additives and Contaminants* A, 32, 1637–1646.

Hayes, J. (2013). Determination of florfenicol in fish feeds at high inclusion rates by HPLC-UV. *Journal of AOAC International*, 96, 7–11.

Kowalski, P., Konieczna, L., Chmielewska, A., Olędzka, I., Plenis, A., Bieniecki, M., Lamparczyk, H. (2005). Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 983–989.

León, N., Pastor, A., Yusà, V. (2016). Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 149, 43–52.

Liu, H.Y., Lin, S.L., Fuh, M.R. (2016). Determination of chloramfenicol, Tiamfenicol and florfenicol in milk and honey using modified QuEChERS extraction coupled with polymeric monolith-based capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 150, 233–239.

Luo, P., Chen, X., Liang, C., Kuang, H., Lu, L., Jiang, Z., Shen, J. (2010). Simultaneous determination of thiamfenicol, florfenicol and florfenicol amine in swine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with immunoaffinity chromatography clean-up. *Journal of Chromatography B*, 878(2), 207–212.

Nebot, C., Guarddon, M., Seco, F., Iglesias, A., Miranda, J.M., Franco, C.M., Cepeda, A. (2014). Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS. *Food Control*, 46, 495–501.

Nebot, C., Iglesias, A., Regal, P., Miranda, J., Cepeda, A., Fente, C. (2012). Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 22, 78–85.

Peng, L., Yueming, Q., Huixia, C., Ying, K., Yingzhang, T., Daning, W., Mengxia, X. (2006). Simultaneous determination of chloramfenicol, tiamfenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 24, 14–18.

Piatkowska, M., Jedziniak, P., Zmudzki, J. (2016). Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal

products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 197, 571–580.

Pietro, W.J., Woźniak, A., Pasik, K., Cybulski, W., Krasucka, D. (2014). Amfenicols stability in medicated feed–development and validation of liquid chromatography method. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58, 621–629.

Reglamento 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L15, 20 de enero de 2010; 1-72.

Reglamento 2019/4 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, relativo a la fabricación, comercialización y uso de piensos medicamentosos, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L4; 7 de enero de 2019; 1-23.

Robert, C., Gillard, N., Brasseur, P.Y., Ralet, N., Dubois, M., Delahaut, P. (2015). Rapid multiresidue and multi-class screening for antibiotics and benzimidazoles in feed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control*, 50, 509–515.

Samanidou, V., Kaltzi, I., Kabir, A., Furton, K.G. (2016). Simplifying sample preparation using fabric phase sorptive extraction technique for the determination of benzodiazepines in blood serum by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 30, 829–836.

Shinoda, N., Kojima, F., Sugiura, K. (2011). Simultaneous determination of residues of chloramfenicol and florfenicol in animal



feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Resid. Sci. Technol.*, 8, 125–129.

Van de Riet, J.M., Potter, R.A., Christie-Fougere, M., Burns, B.G. (2003). Simultaneous determination of residues of chloramfenicol, tiamfenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86, 510–514.

Wei, R., Ge, F., Chen, M., Wang, R. (2012). Occurrence of ciprofloxacin, enrofloxacin, and florfenicol in animal wastewater and water resources. *Journal of environmental quality*, 41, 1481–1486.

Xiao, Z., Song, R., Rao, Z., Wei, S.; Jia, Z., Suo, D.; Fan, X. (2015). Development of a subcritical water extraction approach for trace analysis of chloramfenicol, tiamfenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry tissues. *Journal of Chromatography A*, 1418, 29–35.

Xie, X., Wang, B., Pang, M., Zhao, X., Xie, K., Zhang, Y.; Dai, G. (2018). Quantitative analysis of chloramfenicol, tiamfenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs via liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 269, 542–548.

Yang, J., Sun, G., Qian, M., Huang, L., Ke, X., Yang, B. (2017). Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of florfenicol in animal feedstuffs. *Journal of Chromatography B*, 1068, 9–14.

Zhang, S., Liu, Z., Guo, X., Cheng, L., Wang, Z., Shen, J. (2008). Simultaneous determination and confirmation of chloramfenicol, tiamfenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 875, 399–404.



## **CAPÍTULO 7**

### **CONCLUSIONES GENERALES**

Teniendo en cuenta las necesidades detectadas en el sector de la producción de piensos y la legislación vigente, el desarrollo de este trabajo de investigación ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

**Primera.** Se han desarrollado tres nuevos métodos de análisis de piensos capaces de identificar y confirmar la presencia de coccidiostáticos y de antimicrobianos a niveles residuales debidos a contaminación cruzada, creando así herramientas válidas para el control en la industria y en el sector ganadero, que además podrían aplicarse al análisis de muestras oficiales, ya que han sido validados según los criterios de la legislación comunitaria actual.

Uno de estos métodos permite el análisis de 7 coccidiostáticos, (decoquinato, lasalocid, maduramicina, monensina, narasina, robenidina, salinomicina) por debajo del LM establecido para piensos en la legislación europea, para cada uno de ellos según la especie de destino. Simultáneamente, este método permite analizar la presencia de trazas de 9 sulfonamidas (sulfadiazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfapiridazina, sulfaclopiridazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol) y de trimetoprim.

Se ha desarrollado otro método para determinar la presencia de niveles residuales de tetraciclina doxiciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina (400 µg/kg).

Por último, se ha desarrollado un método que permite la detección y cuantificación de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol (desde 40 µg/kg) a niveles trazas.

**Segunda.** Se ha desarrollado un método sencillo y fiable para la determinación de tetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina en piensos medicados, útil para comprobar con exactitud la concentración en el producto final (50-500 mg/kg), validado según la legislación vigente comunitaria.

**Tercera.** Cada uno de estos métodos se ha aplicado satisfactoriamente en muestras reales recogidas en fábricas y en granjas, pues se confirmó que los métodos desarrollados son eficaces, es decir, o bien la cuantificación era la esperada (medicados), o bien han sido capaces de detectar la presencia de trazas. Una vez evaluados los resultados, se ha comprobado que la contaminación cruzada es un hecho.

**Cuarta.** Los antimicrobianos, en concreto las sulfonamidas, fueron las que causaron mayor número de incidencias respecto a los aditivos antiparasitarios. Es decir, del conjunto de muestras analizadas mediante el método de detección simultánea de coccidiostáticos, sulfonamidas y trimetoprim, las sulfonamidas fueron las sustancias detectadas con mayor frecuencia como consecuencia de la contaminación cruzada y en concreto, la sulfadiazina (39% en granjas y 36% en fábricas). En cuanto al grupo de coccidiostáticos analizados por este mismo método, se obtuvo un porcentaje de contaminación cruzada del 2% en muestras de granjas y un 16% en muestras de fábricas.

**Quinta.** Con el uso del método de análisis de residuos de tetraciclinas en muestras reales, se constataron también problemas de contaminación cruzada, ya que estas sustancias se detectaron en el 15% de las muestras tomadas en granjas y en el 6% de las muestras procedentes de fábricas.

**Sexta.** Por lo que respecta a la aplicación del método de análisis de residuos de fenicoles, se detectó contaminación cruzada de florfenicol en un 3% de las muestras recogidas en fábricas y en cambio, no fue detectada ninguna sustancia del grupo en las muestras recogidas en granjas.





## APÉNDICE







ARTICLES



## Simultaneous analysis of coccidiostats and sulphonamides in non-target feed by HPLC-MS/MS and validation following the Commission Decision 2002/657/EC

Rosa Elvira Gavilán<sup>a</sup>, Carolina Nebot , Ewelina Patyra , Jose Manuel Miranda , Carlos Manuel Franco  and Alberto Cepeda 

<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain; <sup>b</sup>Department of Hygiene of Animal Feedstuffs, National Veterinary Research Institute, Pulawy, Poland

### ABSTRACT

Taking into consideration the maximum level (ML) for coccidiostats included in the European Regulation 574/2011 and the fact that the presence of residues of sulphonamides in non-target feed is forbidden, the aim of this article is to present an analytical method based on HPLC-MS/MS for the identification and quantification of sulphonamides and coccidiostats in non-target feeds. The method was validated following Commission Decision 2002/657/EC, and recovery, repeatability and reproducibility were within the limits established in the Decision. For coccidiostats, the decision limit and detection capability were calculated for the different species taking into account the ML allowed in Regulation 574/2011. The applicability of the method was investigated in 50 feed samples collected from dairy farms, 50 obtained from feed mills and 10 interlaboratory feed samples.

### ARTICLE HISTORY

Received 4 December 2017  
Accepted 30 March 2018

### KEYWORDS



Non-target feed;  
coccidiostats;  
sulphonamides; HPLC-MS/  
MS


### Introduction

The problems caused by bacterial resistance have forced the authorities to increase controls on antibiotics and reduce their use as much as possible, especially for animal food production. Since 2006, antibiotic use is allowed for treatment of animals, but not as growth promoters. According to the seventh European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) report, which compiled sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries during 2015, antimicrobials are sold in the form of premixes (43.4%), oral powders (19.1%) and oral solutions (28.6%) (European Medicines Agency 2015). The largest quantities of antimicrobials sold were tetracyclines (32.8%), penicillins (25.0%) and sulphonamides (11.8%). In particular, Spain sold the largest amount of sulphonamides (342.1 tonne). After Cyprus, Spain sold the largest amount of sulphonamide premixes (282.3 mg per Population Correction Unit). The use of sulphonamides in medicated feed is clearly common, especially in Spain, and carry-over problems may occur in mill feed during medicated feed production, as has been shown

for coccidiostats (Galarini et al. 2009). Commission Directive 2009/8/EC was implemented due to unavoidable carry-over problems of coccidiostats during feed manufacture (EC 2009). This Directive sets up MLs for these drugs in non-target feed (non-medicated). Additionally, Regulation 574/2011 sets authorised levels of feed additives in non-target feed following unavoidable carry-over. Therefore methods are needed for their control (EC 2011).

Feed composition is variable, and raw materials depend on animal species, age and sex. Therefore, the development of a reliable method for the analysis of residues of feed additives and veterinary drugs in feed could be expensive and time consuming, involving several steps for extract purification. Methods for the analysis of coccidiostats in food matrices (liver, muscle, milk and egg) can easily be found in the literature (Capurro et al. 2005; Olejnik et al., 2009; Galarini et al. 2011). For sulphonamides, a complete review on these methods was conducted by Dmitrienko et al. (2014). Regarding the analysis of feed, several methods were reported for coccidiostats in non-target feed after the publication of

**CONTACT** Carolina Nebot  carolina.nebot@usc.es  Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

Color versions of one or more figures in this article can be found online at [www.tandfonline.com/tfoc](http://www.tandfonline.com/tfoc).

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

## Article

# Analysis of Tetracyclines in Medicated Feed for Food Animal Production by HPLC-MS/MS

Rosa Elvira Gavilán <sup>1,†</sup>, Carolina Nebot <sup>1,†,\*</sup>, Jose Manuel Miranda <sup>1,†</sup>,  
Yolanda Martín-Gómez <sup>2,†</sup>, Beatriz Vázquez-Belda <sup>1,†</sup>, Carlos Manuel Franco <sup>1,†</sup>  
and Alberto Cepeda <sup>1,†</sup>

Received: 31 July 2015; Accepted: 15 December 2015; Published: 24 December 2015

Academic Editor: Christopher C. Butler

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; Rosaelvira.gavilan@rai.usc.es (R.E.G.); josemanuel.miranda@usc.es (J.M.M.); beatriz.vazquez@usc.es (B.V.-B.); carlos.franco@usc.es (C.M.F.); cepeda@usc.es (A.C.)

<sup>2</sup> Laboratorio de Sanidad Animal, Lugar Barrio Jove de Arriba, 0 S/N, 33290 Gijón, Spain; yolanda.martingomez@asturias.org

\* Correspondence: Carolina.nebot@usc.es; Tel.: +34-982-822-454; Fax: +34-982-254-592

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** The use of medicated feed is a common practice in animal food production to improve animal health. Tetracyclines and  $\beta$ -Lactams are the groups that are most frequently added to this type of feed. The measurement of the concentration of the analytes in these types of samples is sometimes due to the matrix characteristic, and manufacturers are demanding fast, precise and reproducible methods. A rapid confirmatory method based on a simple extraction protocol using acidified methanol and followed by high performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer for the quantification of four tetracyclines in feed is presented. Validation was performed following the guidelines of Decision 2002/657/EC. Results indicated that the four tetracyclines can be identified and quantified in a concentration range between 50 and 500 mg/kg with recoveries between 84% and 109% and RSD for precision under reproducible conditions between 12% and 16%. Satisfactory results were also obtained with interlaboratory studies and by comparing the method with an HPLC-Fluorescent method.

**Keywords:** feed; antimicrobial; tetracyclines; HPLC-MS/MS; Decision 2002/657/EC

## 1. Introduction

Meat consumption increases each year and, consequently, so does food production of animal origin [1]. To increase production and reduce cost, animals are raised intensively in farms; big farms require greater control of animal health because illnesses can be easily transmitted from one animal to another and cause large economic losses. Therefore, the use of veterinary drugs in food production is very important for controlling and improving animal health. These substances are not only used for therapeutic treatment but also for prophylaxis.

Pharmaceuticals can be administered to animals in various forms including tablets, suspensions, emulsions, injections, implants and creams. A common practice is the administration of pharmaceuticals for prophylactic purposes through food. Intensively produced animals are often fed with concentrated feed, which are a mixture of various materials (oats, wheat, barley, rye, cottonseed, and crambe) and additives. Various classes of veterinary medicines are administered through feed as prophylactic treatment, including antibiotics (sulphonamides, tetracyclines and  $\beta$ -Lactams) and anti-parasitic agents (coccidiostats and ivermectins). As in humans, the pharmaceutical dose will depend on

## Research Article

# A Confirmatory Method Based on HPLC-MS/MS for the Detection and Quantification of Residue of Tetracyclines in Nonmedicated Feed

Rosa E. Gavilán, Carolina Nebot, Maria Veiga-Gómez, Paula Roca-Saavedra, Beatriz Vazquez Belda, Carlos M. Franco, and Alberto Cepeda

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

Correspondence should be addressed to Carolina Nebot; carolina.nebot@usc.es

Received 25 February 2016; Accepted 5 July 2016

Academic Editor: Karoly Heberger

Copyright © 2016 Rosa E. Gavilán et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The Commission Regulation 574/2011/EC set up maximum levels of coccidiostats and histomonostats in nonmedicated feed as a consequence of carry-over during manufacturing. Carry-over takes place from medicated to nonmedicated feed during feed production. Similar contamination could also occur for other pharmaceuticals such as tetracyclines, a group of antibiotics commonly employed in food production animal. The objective of this work is to present a simple and fast method for the simultaneous detection of four tetracyclines (chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline, and tetracycline) in nontarget feed at a  $\mu\text{g/kg}$  level. Validation of the method was performed according to the guideline included in the Commission Decision 2002/657/EC for official method. The validated method was successfully applied to 50 feed samples collected from different milk farms and 25 samples obtained from feed manufacturers. While oxytetracycline was the tetracycline most frequently detected, chlortetracycline was the analyte measured at the highest concentration 15.14 mg/Kg. From 75 nonmedicated feed analysed 15% resulted to be positive for the presence of one tetracycline.

## 1. Introduction

The demand for food of animal origin increases each year. To satisfy this demand, livestock production within the European Union (EU) in 2011 was approximately 10 million heads of goats, 80 million heads of sheep, 80 million heads of cattle, and 150 million heads of pigs [1]. To produce safe and nutritional food products, the animals need to be in good health. Like humans, animals also get sick and need medicines. Even though veterinary medicines contribute to improving and maintaining animal health, administration of these medicines by the farmer is carried out under licence via a veterinarian. The amount of drugs employed in food production estimated by Kools et al. was 6051 t, with antibiotics the most frequently used class of drug (5393 t) [2]. The groups of tetracyclines and  $\beta$ -lactams were used in high amounts and antiparasitic agents (194 t) were the second most frequently used class of drug.

Intensively produced animals are often fed with concentrated feed, a mixture of various materials (oats, wheat, barley, rye, cottonseed, and crambe) and additives. Antibiotic and antiparasitic agents are the classes of drugs most commonly administrated. Antibiotic sulphonamides, tetracyclines, and  $\beta$ -lactam are the most frequently used antibiotics, and coccidiostats and ivermectin are the most frequently used antiparasitic agents. Coccidiostats and histomonostats are a group of antiparasitic agents that have been shown to be persistent during the manufacture of feed and carry-over of this type of drugs has been demonstrated. The EU introduced maximum levels for these substances in nontarget feed in 2009 [3]; this regulation was later modified for some coccidiostats by the Regulation EC/574/2011 [4].

Cross contamination between medicated and nonmedicated feed could occur with any type of drug added to the feed, not only to coccidiostats, particularly when the cleaning process between batches is inefficient. Recently,

# Determination of Florfenicol, Thiamfenicol and Chloramfenicol at Trace Levels in Animal Feed by HPLC–MS/MS

Rosa Elvira Gavilán <sup>1</sup>, Carolina Nebot <sup>1,\*</sup>, Ewelina Patyra <sup>2</sup>, Beatriz Vazquez <sup>1</sup>,  
Jose Manuel Miranda <sup>1</sup> and Alberto Cepeda <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; rosaelviraclg@yahoo.es (R.E.G.); beatriz.vazquez@usc.es (B.V.); josemanuel.miranda@usc.es (J.M.); alberto.cepeda@usc.es (A.C.)

<sup>2</sup> Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs, National Veterinary Research Institute, 24–100 Pulawy, Poland; ewelinapatyra@gmail.com

\* Correspondence: carolina.nebot@usc.es

Received: 20 March 2019; Accepted: 30 April 2019; Published: 7 May 2019

**Abstract:** Administration of florfenicol and thiamfenicol through medicated feed is permitted within the European Union, always following veterinary prescription and respecting the withdrawal periods. However, the presence of low levels of florfenicol, thiamfenicol, and chloramfenicol in non-target feed is prohibited. Since cross-contamination can occur during the production of medicated feed and according to Annex II of the European Regulation 2019/4/EC, the control of residue levels of florfenicol and thiamfenicol in non-target feed should be monitored and avoided. Based on all the above, a sensitive and reliable method using liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for the simultaneous detection of chloramfenicol, florfenicol, and thiamfenicol at trace levels in animal feed. Analytes were extracted from minced feed with ethyl acetate. Then, the ethyl acetate was evaporated, the residue was resuspended in Milli-Q water and the extract filtered. The method was in-house validated at carryover levels, with concentration ranging from 100 to 1000 µg/kg. The validation was conducted following the European Commission Decision 2002/657/EC and all performance characteristics were successfully satisfied. The capability of the method to detect amfenicols at lower levels than any prior perspective regulation literature guarantees its applicability in official control activities. The developed method has been applied to non-compliant feed samples with satisfactory results.

**Keywords:** non-target feed; florfenicol; thiamfenicol; chloramfenicol; HPLC–MS/MS; validation; swine

## 1. Introduction

Globalization permits food produced in one country to be sold in other countries, sometimes on an intercontinental level. However, globalization also contributes to competition between production companies. The final goal of any type of business is to have low production cost and high benefits. Low production cost is very important in food of animal origin, for which farmers fight with animal disease. The use of certain veterinary medicine is permitted to control, prevent, and treat illness. The most employed medicines, in this case, include antibiotics and antiparasitic agents. Antimicrobial medicines are sold as premixes, oral powders, oral solutions, injections, intramammary preparations pastes, oral pastes, boluses and intrauterine preparations [1]. Fenicols (chloramfenicol, thiamfenicol, and florfenicol) belong to this group of antibiotics; however, even if chloramfenicol is very effective on a broad spectrum, it is prohibited in food-producing animals within the European Union [2]. On